

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1928-1929 N° 109

TRAVAIL DE L'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DE LYON

ETUDE ANALYTIQUE

de la

TOXINE DIPHTERIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 22 Juin 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jeanne CLAVEL

Interne des Hôpitaux

Diplômée d'Hygiène et de Bactériologie à la Faculté

Préparateur à l'Institut Bactériologique

Née le 2 Juin 1902 à St-ETIENNE (Loire)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1929

**ÉTUDE ANALYTIQUE
DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année Scolaire 1928-1929 N° 109

TRAVAIL DE L'INSTITUT BACTÉRIOLOGIQUE DE LYON

ETUDE ANALYTIQUE
de la
TOXINE DIPHTERIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 22 Juin 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Jeanne CLAVEL

Interne des Hôpitaux

Diplômée d'Hygiène et de Bactériologie à la Faculté

Préparateur à l'Institut Bactériologique

Née le 2 Juin 1902 à St-ETIENNE (Loire)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1929

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire M. L. HUGOUNENQ
Doyen M. J. LEPINE.
Assesseur M. ROLLET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE, BARD, LANNOIS.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC.
Cliniques chirurgicales	PAVIOU
Clinique obstétricale et Accouchements	TIXIER.
Clinique ophtalmologique	BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique	ROLLET.
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires	VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	COLLET.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	ROCHET.
Chimie biologique et médicale	NOVE-JOSSERAND
Chimie organique et Toxicologie	CLUZET.
Matière médicale et Botanique	HUGOUNENQ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL.
Anatomie	BRETIN.
Histologie	GUIART.
Physiologie	LATARJET.
Pathologie interne	POLICARD.
Pathologie et Thérapeutiques générales	DOYON.
Anatomie pathologique	FROMENT.
Chirurgie opératoire	CADE.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie	FAVRE.
Médecine légale	PATEL.
Hygiène	ARLOING (F.)
Thérapeutique	Etienne MARTIN.
Pharmacie	COURMONT (P.).
Hydrologie thérapeutique et climatologie	SAVY.
	LEULIER.
	PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe	MM. VALLAS.
— — — Prépéductive de gynécologie	CONDAMIN.
— — — Chimie minérale	BARRAL
— — — Urologie	GAYET.

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. THEVENOT (Léon).
Puériculture et hygiène de la première enfance	RHENTER.
Chirurgie expérimentale	TAVERNIER.
Stomatology	TELLIER.

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
GARIN.	ROUBIER.	CHALIER (André).	DEVIC.
TRILLAT.	BONNET.	CHALIER (Joseph).	GABRIELLE.
SARVONAT.	RHENTER.	NOEL.	MANCEAU.
FLORENCE (G.).	MAZEL.	CHEVALLIER.	MARTIN (Joseph).
ROCHAIX.	SANTY.	DUMAS.	ROCHET (Ph.).
CORDIER (V.).	DUNET.	DUFOUT.	WERTHEIMER.
			GATE.

M. BAYLE, secrétaire.



EXAMINATEURS DE LA THESE

MM. COURMONT, président ; LEULIER, assesseur ;
ROCHAIX et CHALIER J., agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MA MÈRE, A MON FRÈRE

A MON MARI

A MES CAMARADES INTERNES

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL COURMONT

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEULIER

Dès le début de ce travail, nous voulons témoigner notre reconnaissance à M. le Professeur Paul COURMONT. Il est notre maître à l'Institut Bactériologique de Lyon. Sa grande bienveillance à notre égard n'a cessé d'encourager nos travaux, en s'intéressant à nos recherches, et en nous accordant largement les moyens de travail que nous lui demandions. Qu'il veuille bien trouver, exprimée ici, l'assurance de notre respect et de notre profond attachement.

M. le Professeur LEULIER fut toujours avec nous d'une bienveillance et d'une patience inlassables. Il nous a si obligeamment prodigué ses conseils, et, par son travail personnel, a si largement contribué au mérite de cette thèse, que nous ne savons comment lui exprimer nos sentiments de vive gratitude et de sincère admiration.

M. le Professeur agrégé ROCHAIX a bien voulu faire partie de notre jury de thèse. Nous l'en remercions de tout cœur et l'assurons de nos sentiments très reconnaissants.

En acceptant de juger notre thèse, M. le Professeur Agrégé J. CHALIER, nous donne une nouvelle marque de l'intérêt qu'il nous a toujours porté. Nous en sommes infiniment touchée, et le remercions de l'enseignement inoubliable qu'il nous a prodigué, en l'assurant de notre respectueuse gratitude.

M. le Docteur PÉHU, médecin des Hôpitaux, fut pour nous un maître aimable et indulgent. Au cours d'une année passée dans son service hospitalier, nous avons pu apprécier son enseignement clinique, si clair, et constamment émaillé de conseils pratiques. Qu'il

veuille bien accepter ce témoignage de notre grande admiration et de nos sentiments de très respectueuse affection.

Voici quatre années que M. le Docteur SÉDALLIAN nous a admise dans son laboratoire de l'Institut Bactériologique, et chaque jour nous apprécions davantage les qualités d'originalité de son esprit. Nous tenons, au début de ce travail, qui est le sien plus que le nôtre, à le remercier bien sincèrement et à l'assurer de notre respectueuse amitié.

Nous adressons aussi nos sentiments de vive reconnaissance à ceux dont nous avons eu l'honneur d'être l'externe ou l'interne au cours de nos études médicales. MM. les Professeurs BARD, VILLARD, BÉRARD, NOVÉ-JOSSERAND, MM. les Docteurs DELORE, PALLASSE, TAVERNIER, SANTY, TRILLAT, nous ont accueilli dans leurs services hospitaliers avec une grande affabilité, dont nous les remercions bien sincèrement.

MM. les Docteurs GALLAVARDIN, BÉRIEL et DEVIC furent pour nous des maîtres bienveillants, dont l'enseignement contribua pour une large part à notre culture médicale.

Que tous nos Maîtres trouvent dans ce modeste travail l'expression de notre gratitude et de notre dévouement.

Nous ne voudrions pas oublier les multiples services que nous ont rendu le personnel du laboratoire des Sérums à l'Institut Bactériologique, et celui du laboratoire de Pharmacologie de l'Hôpital Desgenettes. Nous les remercions, et les assurons de notre gratitude, pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

Travaux antérieurs
de l'Institut Bactériologique de Lyon
(SERVICE DES SÉRUMS)
sur la toxine diphtérique

DURAND (Paul). — Les types de bacilles diphtériques. Valeur du sérum antidiphtérique antimicrobien. *Thèse Lyon*, 1921.

— *C. R. Soc. Biol.*, 1918, p. 1011 ; 1920, p. 611 ; 1920, p. 613 ; 1921, p. 982.

— *Journ. de Méd. de Lyon*, 1920, p. 509.

DURAND (Paul) et GUÉRIN. — *C. R. Soc. Biol.*, 1921, p. 980.

DURAND (Paul) et SÉDALLIAN. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, pp. 88, 788.

SÉDALLIAN et GAUMOND (Mlle). — Sur l'isolement de la fraction active de la toxine diphtérique par abaissement du pH, *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 93.

LEULIER, SÉDALLIAN et GAUMOND (Mlle). — Etude analytique de la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 1543.

— Toxine diphtérique, nucléoprotéides et dialyse. *C. R. Acad. des Sciences*, 1927, 185, 902.

LEULIER, SÉDALLIAN et CLAVEL (Mme). — Conservation du pouvoir antigène dans la toxine diphtérique précipitée. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 99, 1746.

— Répartition et stabilité des propriétés antigènes de la toxine diphtérique. Rôle des colloïdes non spécifiques. *C. R. Acad. des Sciences*, 1928, 187, 1297.

— Etudes sur la toxine diphtérique. Analyse chimique et analyse biologique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 413, 436.

— Sur la formation de la toxine et de l'anatoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, 679.

Introduction

Le problème de l'étude des toxines microbiennes peut être posé de diverses façons. Une toxine étant nuisible pour l'animal, on peut rechercher le degré de sa toxicité, les différentes réactions des espèces sensibles à son activité, le moyen de vacciner contre la maladie qu'elle peut provoquer.

Les modifications qu'elle apporte dans l'organisme sont l'objet d'autres recherches. Il s'agit soit de phénomènes biologiques : diffusion de cette toxine, propriétés du sérum et des humeurs, soit de lésions anatomiques, étude des lésions créées, modifications dans la structure de certains organes, défense des cellules contre la maladie.

Enfin, il reste à interpréter le mode d'action de la toxine : comment va-t-elle déterminer les réactions de l'organisme, et par quel mécanisme ? La toxine agit-elle directement, comme on le croit habituellement, sur les éléments qu'elle lèse, ou, au contraire, son activité est-elle transmise par une substance intermédiaire, sans laquelle la toxine reste impuissante. Jules Courmont et Doyon pensent qu'il en est ainsi pour la toxine tétanique, celle-ci ne devenant active que par

formation, dans l'organisme inoculé, d'une seconde substance, toxique après incubation.

Delezenne et Mlle Ledebt, à la suite d'expériences sur le venin du cobra, démontrent que celui-ci n'agit qu'en permettant la formation d'une lysocithine toxique.

Mais toutes ces recherches tentent à résoudre le problème de l'intoxication et non celui de la toxine elle-même.

L'étude de la toxine essaye de se rendre compte de la façon dont s'élabore le principe toxique à partir d'une souche microbienne, au sein d'un milieu complexe ; elle voudrait connaître sa nature, analyser sa constitution, établir pour ainsi dire par une formule sa composition chimique.

Au point de vue biologique, il faut dissocier chacun des pouvoirs de la toxine, étudier leurs dépendances réciproques et les influences qui les régissent, voir dans quelle mesure ils se correspondent. Mais la toxine telle que nous l'obtenons aujourd'hui forme un tout de composition chimique extrêmement complexe, et dont les propriétés biologiques sont toutes liées les unes aux autres. Il faut libérer, des éléments inutiles et accessoires du bouillon, une toxine purifiée, d'étude moins difficile, mais dans laquelle on doit retrouver intégralement toutes les propriétés biologiques dont la présence, mises en évidence sur l'animal, sera le témoin de l'intégrité absolue de éléments chimiques du principe toxique.

Les essais ont été nombreux. C'est vers ce point que gravitent les expériences que nous avons entre-

prises depuis plusieurs années. Mais c'est là une étude délicate, qui se heurte constamment à des difficultés souvent insurmontables. Nous apportons quelques faits certains, qui seront exposés tels que nous les avons observés, et desquels nous essayerons de donner une interprétation qui, pour le moment, nous paraît justifiée.

La toxine diphtérique. Ses propriétés

Si Roux et Yersin ont découvert la toxine, montré le rôle qu'elle joue dans l'infection diphtérique, Ehrlich, dans des travaux non moins imposants, en a étudié l'évolution générale et les réactions vis-à-vis de l'antitoxine, créant même une unité antitoxique étalon, dans le but de titrer le pouvoir neutralisant d'un sérum, pour une toxine donnée.

Le pouvoir toxique

Dans leurs premiers essais, Roux et Yersin avaient obtenu une toxine, qui tuait le cobaye à la dose de 30 centimètres cubes, en injection intrapéritonéale. Ce fut le début, et rapidement ils eurent des liquides de culture beaucoup plus toxiques, mais dont la dose mortelle ne dépassait pas $1/5^{\circ}$ de centimètre cube. Ehrlich obtint des filtrats mortels à faible dose. Il parle souvent de $1/200^{\circ}$, $1/300^{\circ}$ de centimètre cube comme dose mortelle pour le cobaye. C'est lui qui fut amené à titrer le pouvoir toxique d'une toxine, par

injections à doses croissantes. Il définît la dose mortelle en trois jours, pour un cobaye de 250 grammes, la dose minima mortelle et l'écrivît Lmn. Ces quantités paraissent considérables, et actuellement on peut obtenir une toxine active au 1/500^e de centimètre cube, et même à dose moindre, en filtrant la culture du bacille de Park et Williams n° 7, sur milieu à base de viande de veau et de panse fraîche de porc. Ce milieu, décrit par Louis Martin, est universellement reconnu comme donnant la toxine la plus efficace.

Au cours de ses recherches pour titrer Lmn, Ehrlich s'aperçut que la toxicité d'une toxine diminuait progressivement pour arriver à l'atotoxicité complète, et cela sans qu'on fît intervenir aucune action physique ou chimique. Par le simple vieillissement, une toxine conservée à l'abri de l'air et de la lumière, à une température moyenne de 15°, perdait plus ou moins complètement son pouvoir toxique, et, alors qu'elle tuait au début 1/250, par exemple, elle pouvait, après plusieurs mois, être injectée à la dose de plusieurs Lmn, sans aucun dommage. Mais, dans cette évolution, Ehrlich a remarqué des phases ; la toxine ne perd pas simplement son pouvoir toxique, il semble qu'il se fasse, en son milieu, une sorte de remaniement des substances toxiques, lesquelles se transforment en corps non toxiques. Il est remarquable qu'une toxine déjà vieille, ne tuant plus, donne, injectée à la dose mortelle initiale, des phénomènes particuliers, indiquant une modification du principe toxique. Fréquemment, on observe chez les cobayes injectés de cette manière des troubles au niveau du

point d'inoculation. C'est d'abord de l'alopecie avec œdème dur, scléreux, qui ne se résorbe pas. Parfois, une eschare, qui s'étend peu à peu, guérit quelquefois, mais, le plus souvent entraîne la mort en dix-huit, vingt, trente jours. Dans d'autres cas, plus rares, on observe une paralysie. Tous ces troubles ne sont pas immédiats ; ils apparaissent dix ou quinze jours après l'inoculation ; ils sont souvent mortels : le cobaye maigrit, se cachectise, son poil se hérissé, et il meurt en un mois environ. Combien cette évolution de l'infection diphtérique est différente de celle que l'on voit chez les cobayes injectés avec de la toxine fraîche ! et depuis Ehrlich elle a frappé bien des observateurs.

Le pouvoir antigène

Depuis la découverte de la toxine, constamment les esprits se sont orientés vers la vaccination antidiphtérique. Puisqu'elle échouait avec les bacilles et que, d'autre part, la maladie est une intoxication, elle fût tentée avec la toxine.

Les petites doses furent d'abord utilisées. L'immunité fût acquise par le cheval, et ce mode est encore employé pour obtenir le sérum thérapeutique ; mais elle échoua toujours chez les petits animaux, le cobaye notamment, et ne pût être appliquée à l'homme.

Dès que Behring et Kitasato eurent découvert les propriétés du sérum des grands animaux, immunisés

avec de la toxine pure, on pensa atténuer le principe toxique avec l'antitoxine pour permettre la vaccination. On fit des mélanges neutres (Clintock et Ferry) hyponeutralisés (Behring), hyperneutralisés (Atkinson), de toxine et d'antitoxine. Les résultats furent inconstants. Cependant, Zingher dit que les mélanges hyponeutralisés sont les plus efficaces ; mais Behring conclut, en 1898, qu'il est impossible de vacciner avec les moyens alors en œuvre.

D'autres auteurs firent agir sur la toxine des agents physiques ou chimiques, pensant atténuer ou même supprimer le pouvoir toxique, sans atteindre le pouvoir immunisant.

Le simple vieillissement de la toxine fût utilisé ; Ehrlich avait vu qu'une toxine ancienne perdait peu à peu son pouvoir toxique ; Fraenkel, Hoffmann, Brieger, Wassermann et Kitasato, firent des essais d'immunisation, mais n'obtinrent que des succès inconstants.

C'est alors qu'on essaya d'autres agents physiques et surtout des agents chimiques.

L'action de la chaleur modérée a été utilisée, soit à 37° pendant plusieurs semaines, soit à 50° pendant 24 ou 48 heures. Le premier protocole sera envisagé à propos de l'action du formol ; quant au second, il est relativement ancien et a été employé par Ehrlich et antérieurement par Roux et Yersin. A la température de 50°, la toxine perd, dans les deux tiers des cas environ, ses propriétés toxiques comme ses propriétés immunisantes ; elle est pour ainsi dire détruite, de même par une action de dix minutes à 100°.

Dans les autres cas, elle devient inoffensive, mais conserve son pouvoir vaccinant, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter une substance chimique. Cette étude a été reprise récemment par de Potter, qui n'arrive pas aux mêmes conclusions.

D'autres moyens physiques ont été expérimentés, et c'est ainsi que l'on a tenté d'atténuer la toxine par la lumière (Roux et Yersin, Lowenstein, de Potter), et les rayons ultra-violets.

Le courant électrique fut l'objet d'une étude spéciale. Smirnow et Krüger ont étudié les courants continus; d'Arsonval et Charrin, et plus tard Marmier, l'effet des courants à haute fréquence sur les toxines bactériennes. Ces derniers observent que le courant alternatif atténue notablement la toxicité de la toxine diphtérique : après une action d'un quart d'heure, ils injectent impunément 2 cc. 5 et font même des essais d'immunisation. Mais les résultats sont peu concluants.

Parmi les produits chimiques employés comme agents modificateurs, signalons l'iode, sous forme de solution iodo-iodurée (Roux), ou de trichlorure d'iode (Behring) ; à l'aide de ces toxines atténuées, ces auteurs tentèrent de faire de l'antitoxine.

L'eau oxygénée (Sieber), sans action notable ; l'ozone (Arloing et Troude, Nélis), plus efficace ; le permanganate de soude (Macé), de potasse (Loewy) ; tous ces oxydants ont été étudiés et rassemblés par de Potter. Cet auteur conclut que la toxine diphtérique est peu oxydable, et que seuls, l'ozone et le permanganate de potasse en atténuent la toxicité. L'ozone agit directement sur la toxine, qu'il brunit et atténue d'autant plus que la dilution est plus grande. Le permanganate de potasse, au contraire, n'agit qu'en quantité considérable : 0 gr. 5 de permanganate pour 11 cc. de toxine.

Mais les divergences des auteurs sont grandes sur ce sujet, et de Potter pense qu'elles sont dues à des différences dans le titre des solutions.

Nélis recherche l'action de la quinine ; cette substance inactive totalement la toxine, mais les recherches sont difficiles en raison de sa toxicité propre sur le cobaye.

De nombreuses autres substances chimiques ont été employées : l'éthanal et la benzaldéhyde (Pico et Miravent) ; le trioxyméthylène sulfité (Hollande et Mlle Penn) ; les poudres absorbantes, charbon et kaolin (Loewy) ; les sels de fer et de manganèse en solution colloïdale (Le Fèvre de Arric) ; les ferments : la pepsine, la trypsine (Gamaléia), la ptyaline (Loewy) ; les fragments d'organes eux-mêmes ont été utilisés (Lowenstein, Loewy) ; tous ces corps atténuent plus ou moins la toxine.

L'adrénaline a fait l'objet d'une étude spéciale. A. Marie conclut que l'adrénaline en solution millésimale neutralise cinq à six doses Lmn pour le cobaye ; c'est une action de contact, on ne peut guérir, ni immuniser par l'adrénaline.

Une mention spéciale doit être faite pour les savons et les acides gras. M. le Professeur H. Vincent, en faisant agir les savons sur les toxines, est parvenu à leur faire perdre leur toxicité et à leur conserver leur pouvoir immunisant. Pour rappeler leurs propriétés il a nommé ces produits ainsi modifiés : *cryptotoxines*. Nous n'insisterons pas sur ces cryptotoxines, car elles concernent, surtout dans les travaux de H. Vincent, la toxine tétanique, et nous étudierons l'action du formol sur la toxine, car c'est elle qui nous a servi dans nos expériences.

Pour atténuer la toxicité des toxines, Lowenstein s'est servi du formol, qu'il a fait agir simultanément à la lumière ou à la chaleur à 30°. Il est arrivé à quelque résultat avec la lumière, parvenant à abaisser la

dose mortelle d'une toxine à tel point, qu'après vingt-quatre jours d'exposition, quarante doses mortelles ne provoquaient qu'un peu d'œdème au cobaye. Avec la chaleur, la survie n'était compatible qu'avec l'injection d'un maximum de dix doses mortelles, même après trente-quatre jours à 30° ; il est vrai que la quantité de formol était insuffisante (1 pour 1.000). Ces toxines, non assez atténuées, même la toxine illuminée, ne donnèrent pas d'immunité ; les essais de vaccination étaient faits un peu précocement (quinze jours après l'injection vaccinante).

Ramon, reprenant ces travaux, fut plus heureux, et, en utilisant le formol et la chaleur à 37°, parvint à obtenir une toxine diphtérique atoxique, conservant cependant son pouvoir immunisant. Ses résultats publiés dès les premiers jours de l'année 1923 sont absolument concluants et confirmés chaque jour par tous les expérimentateurs des régions du monde les plus diverses.

Pour obtenir de « l'anatoxine de Ramon », on fait agir simultanément, pendant vingt et un jours, sur le filtrat d'une culture en voile du bacille de Park et Williams N° 7, obtenue en bouillon Martin, le formol (3 pour 1.000 de formol du commerce à 40 %) et la chaleur à 37°.

Le produit obtenu est un liquide limpide, de teinte brune, qui, injecté à des doses considérables (500 Lmn et davantage), ne provoque chez le cobaye aucun œdème de réaction et immunise presque infailliblement. Il faut trois injections pour obtenir une immunité certaine, et voici les chiffres donnés par Louis Martin :

Après la première injection, 36 % sont vaccinés (Shick négatif) ;

Après la deuxième injection, 88 % sont vaccinés (Shick négatif) ;

Après la troisième injection, 98 % sont vaccinés, (Shick négatif).

On comprend qu'après de tels résultats l'immunisation ait été appliquée à l'homme et qu'elle soit actuellement de pratique courante, en attendant d'être obligatoire.

De toutes les substances inactivantes ainsi passées en revue, il ressort bien nettement que, seul, le formol combiné à la chaleur prolongée à 37°, a une action réelle et constante sur le pouvoir toxique, sans porter d'atteinte aucune au pouvoir antigène. C'est d'ailleurs la conclusion à laquelle arrive Nélis dans une étude d'ensemble sur ce sujet.

Cependant, il convient de faire une réserve en faveur des acides gras.

Le pouvoir de fixer l'antitoxine

Dès la découverte des propriétés du sérum, on étudia les réactions de la toxine vis-à-vis de ce nouvel élément : l'antitoxine. Là, les faits ne sont plus de l'observation pure, ils deviennent en apparence paradoxaux et demandent une interprétation ; celle-ci nous est donnée, en 1898, par l'échaffaudage d'une

théorie, peut-être un peu confuse dans le détail, mais qui reste géniale dans l'esprit de ses grandes lignes : la conception d'Ehrlich. Elle est battue en brèche par Arrhénius, Madsen. Plus près de nous, Bordet fonde l'explication du mélange toxine-antitoxine sur de tout autres bases et expose son système des proportions variables.

LE PHÉNOMÈNE D'EHRlich

A côté de la dose Lmn, qui reste à la base de toute expérimentation sur la toxine, Ehrlich a étudié aussi la neutralisation de cette toxine par son antitoxine, dans ses effets sur l'animal d'expérience : le cobaye. En mélangeant en proportions variables de la toxine et de l'antitoxine diphtériques, on trouve des mélanges exactement neutralisés. Pour cela, Ehrlich prenait des doses fixes de sérum, soit une unité antitoxique (IU.A.), auxquelles il ajoutait des doses progressivement croissantes de toxine. Les derniers cobayes injectés mouraient, puis quelques-uns avaient une simple réaction locale (œdème) ; enfin, un animal ne présentait aucun trouble, même très léger : il avait reçu une dose neutre du mélange. La quantité de toxine neutralisant exactement IU.A. d'Ehrlich est la dose neutre, elle se désigne par Lo.

Si, maintenant, à une dose neutre Lo, on ajoute une dose mortelle Lmn, il semble que l'animal doive succomber : il n'en est rien. La dose limite mortelle, L+, est la quantité de toxine qui, ajoutée à IU.A. d'Ehrlich, tue un cobaye de 250 grammes en trois jours. Elle n'est pas égale, comme on pourrait le

penser, à une dose neutre, plus une dose minima mortelle ($Lo + Lmn$), elle lui est infiniment supérieure. C'est ce que l'on appelle le phénomène d'Ehrlich, et cet auteur pense qu'il faut ajouter 101 Lmn à Lo pour faire $L+$.

Pour expliquer ces faits indiscutables, Ehrlich a construit tout un système sur la constitution du poison diphtérique. A côté du principe toxique, appelé toxine, il existe, dans le poison diphtérique, divers éléments, qui se distinguent entre eux par deux caractères principaux : leur affinité différente pour l'antitoxine, leur plus ou moins grande valeur toxique.

Les prototoxoïdes ont pour l'antitoxine une affinité plus grande que celle de la toxine, les syntoxoïdes ont une affinité égale à celle de la toxine, enfin les épitoxoïdes sont moins avides d'antitoxine que la toxine elle-même. Pour plus de facilité, on groupe, sous le terme général de toxoïdes, les prototoxoïdes et les syntoxoïdes, et sous celui de toxones, les épitoxoïdes. Il ressort donc, que les toxoïdes ont pour l'antitoxine une affinité au moins égale à celle de la toxine, tandis que celle des toxones lui est inférieure. Ajoutons que toxoïdes et toxones ne sont pas toxiques, et que seule la toxine mesure le pouvoir toxique du poison diphtérique.

Que se passe-t-il dans le phénomène d'Ehrlich ?

Les toxoïdes ne jouent aucun rôle, les toxones expliquent tout. Soit le mélange Lo parfaitement neutre composé de ;

Toxine neutralisée par antitoxine ;

Toxoïde neutralisée par antitoxine ;

Toxone neutralisée par antitoxine,

et auquel on ajoute successivement des doses mortelles Lmn de poison diphtérique. Les toxines, plus avides, remplaceront les toxones dans le mélange toxone antitoxine de la dose Lo, et il faudra que toutes les toxones soient libérées de leur antitoxine pour qu'une nouvelle dose Lmn puisse agir. Par leur libération, ces toxones ne changent pas la valeur toxique. En déterminant le pouvoir antitoxique de son sérum étalon, Ehrlich s'est servi d'un poison égal en toxines et toxones. 100 Lmn de ce poison contient donc 100 équivalents toxines et 100 équivalents toxones. Il en a conclu que le pouvoir fixateur de son unité immunisante était de 200 équivalents antitoxiques et que pour tuer un cobaye il fallait ajouter à Lo, 101 doses Lmn. Le nombre de toxines équivalentes est donc

de $x = \frac{Lo}{Lmn}$ et par une suite d'équations on peut trouver le nombre de toxones.

Ehrlich avait aussi observé d'autres phénomènes concernant le complexe toxine-antitoxine. Il vit notamment ce fait absolument constant : par vieillissement simple, un poison diphtérique voit son pouvoir toxique baisser à tel point qu'il peut être déclaré atoxique, tandis que sa dose L+ reste constante ou baisse très légèrement. Cela est explicable dans le système d'Ehrlich par le rôle des toxoïdes, qui sont atoxiques, mais possèdent une affinité pour l'antitoxine, affinité qui est égale à celle de la toxine et

reste suffisante pour fixer l'antitoxine lorsque la toxine s'est totalement transformée en toxoïdes. On comprend alors qu'un poison diphtérique vieilli soit atoxique, mais fixe encore une quantité d'antitoxine sensiblement analogue à celle qu'il fixait lorsqu'il possédait toute sa toxicité.

Ce phénomène a été observé aussi par Arrhénius et Madsen, et nombre d'autres auteurs. Récemment nous l'avons encore expérimenté et avons obtenu les résultats suivants, qui précisent la dissociation du pouvoir toxique et du pouvoir fixateur d'antitoxine :

Toxine diphtérique de juin 1926 : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Lmn } 1/400 \text{ cc.}^3 \\ \text{en juin 1926 : } \text{L} + 0 \text{ cc. } 09 \end{array} \right.$

Même toxine titrée en novembre 1928 : $\left\{ \begin{array}{l} \text{Lmn } 1/50 \text{ cc.}^3 \\ \text{L} + 0 \text{ cc. } 10 \end{array} \right.$

En outre, Ehrlich a encore observé ce fait : si l'on ajoute à un poison diphtérique des doses croissantes d'antitoxine, la toxicité n'est d'abord pas diminuée, puis, à partir d'un certain chiffre, elle baisse progressivement. Ehrlich explique ceci en disant qu'il y a des prototoxoïdes qui ont une plus grande affinité pour l'antitoxine que la toxine elle-même, nous l'avons déjà vu. Ce phénomène, peut-être inconstant, n'a jamais été observé dans la suite, notamment par Arrhénius.

Mais si la conception d'Ehrlich est séduisante et explique les faits observés de façon remarquable, elle fût battue en brèche par divers auteurs, qui basèrent sur le phénomène d'Ehrlich d'autres théories.

Arrhénius, au lieu de faire du poison diphtérique un corps complexe, pense qu'il s'agit plutôt d'une

substance homogène, susceptible de se transformer, au cours de son évolution et sous diverses influences, en un corps non toxique : les toxoïdes. Mais il rejette absolument l'hypothèse des prototoxoïdes et des toxones, qui n'ont été introduites dans la science, pense-t-il, que pour expliquer ce fait, que la neutralisation du mélange toxine-antitoxine ne se fait pas suivant une droite, mais suivant une ligne courbe; c'est que la constante de neutralisation n'est pas zéro, mais égale à une grandeur déterminée.

Arrhénius et Madsen raisonnent par analogie. La neutralisation d'un alcali fort par un acide fort, se fait exactement, et peut être représentée par une ligne droite. Au contraire; celle d'une base faible et d'un acide faible se fait suivant une courbe; une petite quantité d'alcali reste toujours libre, il en est de même pour l'acide.

Or, cette courbe est absolument comparable à celle de la neutralisation d'une toxine par son antitoxine. Les premières parties d'antitoxine introduites dans une toxine neutralisent davantage d'unités toxiques, que les dernières portions d'antitoxine ajoutées. C'est ce qui a été vu pour la réaction acide base faibles.

Il y a donc une analogie absolue, les mêmes lois doivent régir les mêmes phénomènes et le mélange toxine-antitoxine peut être représenté par une constante.

Pour fixer cette constante, on détermine expérimentalement les quantités d'anticorps qui restent libres dans deux mélanges, contenant des quantités différentes de cet anticorps. La formule permet de trouver combien on doit retrou-

ver d'antigène, et l'on compare les chiffres fournis. Cette constante est égale à 0,0122 et montre que la courbe de neutralisation ne peut pas être une droite.

Ainsi se trouvent expliqués les faits constatés par Ehrlich. Cependant, Arrhénius et Madsen, sans admettre l'existence des toxones, pensent que les solutions concentrées d'antitoxine présentent des perturbations, dues, probablement, à une forte baisse de la vitesse de réaction, en présence de concentrations élevées.

De nombreux auteurs se sont ralliés à la théorie d'Arrhénius et Madsen, notamment Grüber et Pirquet, qui opposent au spectre toxique d'Ehrlich (nombre d'unités toxiques que chaque fraction d'antitoxine est capable de neutraliser) une nouvelle notion : la quantité de toxine qui a résisté à l'addition de sérum. La courbe est en zig-zag dans le spectre d'Ehrlich, elle est régulière, dans la figure de Grüber, et n'atteint jamais le zéro.

Von Dungern admet, comme Ehrlich, les diverses affinités des différents composants de la toxine ; il pense qu'il existe encore, outre les toxines, cependant capables de donner des lésions, torpides il est vrai, mais réelles, des épitoxonoïdes absolument inoffensives qui fixeraient de l'antitoxine.

Ces deux conceptions, celle d'Ehrlich, qui envisage la toxine comme un corps complexe, et celle d'Arrhénius et Madsen, qui la voit homogène, ont cependant ce trait commun : elles supposent que, toujours et dans n'importe quelles conditions, toxine et anti-

toxine s'unissent dans des proportions fixes. Ehrlich avait même exprimé cette affirmation en chiffres et énoncé la loi des proportions fixes. Or ceci n'est basé sur aucune expérience, et l'on peut, faisant abstraction de cette hypothèse, construire un système totalement différent.

Bordet pense que toxine et antitoxine peuvent s'unir en proportions variables, suivant les quantités de chacune d'elles qui se trouvent en présence. Il pose alors sa loi des proportions variables et à partir d'elle, élabore une conception qui raisonne le complexe toxine-antitoxine.

Soient, dit Bordet :

T : une molécule de toxine,

A1 : une molécule d'antitoxine,

A2 : deux molécules d'antitoxine,

A3 : trois molécules d'antitoxine,

A4 : quatre molécules d'antitoxine,

A5 : cinq molécules d'antitoxine, etc...,

le mélange TA2 sera plus toxique que TA3, mais, dans les deux cas, l'antitoxine se répartira également sur chaque molécule de toxine, et il ne restera pas de toxine libre. Chaque molécule de toxine fixe une dose insuffisante d'antitoxine, lorsque la quantité totale d'antitoxine est insuffisante pour neutraliser la dose totale de toxine. Et l'on peut observer tous les degrés entre la toxine active et la toxine exactement neutralisée (*stades d'atténuation progressive de Bordet*). Il se forme donc un complexe particulier, lorsqu'on met en présence une quantité de toxine plus grande que la quantité d'antitoxine correspondante. Ce complexe

est, pour Bordet, analogue, identifiable même, aux toxones ; en effet : les toxones sont moins toxiques que la toxine, moins avides d'antitoxine ; ils sont rattachables à la toxine, mais constituent cependant un corps nouveau ; ils sont antigènes (Dreyer et Madsen), tous caractères accordés à une toxine insuffisamment neutralisée. De plus, l'existence des toxones n'a jamais été prouvée ; Calcar, par une dialyse sous pression progressivement croissante a bien pensé les isoler, mais ses résultats n'ont jamais été retrouvés par d'autres auteurs, en particulier par Römer.

Par suite, Bordet met en doute l'authenticité des toxones, en tant que substances libres et distinctes. Ses réserves ne visent pas les travaux d'Ehrlich, mais il pense qu'il peut exister des toxines, modifiées sous l'influence de l'antitoxine, du vieillissement, de la chaleur, toutes ces actions s'exerçant de façon analogue, pour réduire l'activité de la toxine.

Ultérieurement, se rattachèrent à la théorie de Bordet nombre d'expérimentateurs, parmi lesquels : Nerst, qui compare le mélange toxine-antitoxine à un phénomène de teinture, il y a fixation (réversible), suivie d'une modification irréversible ; puis, Sachs pense que la toxine est analogue à un acide polybasique, partiellement saturé dans ses groupes acides, de cette façon s'expliquerait la diminution de la toxicité ; enfin Biltz, Much et Siébert.

PHÉNOMÈNE DE BORDET-DANYSZ

L'expérience de Bordet (1900), relative à l'hémolyse, constitue la base du phénomène. La quantité

totale de globules rouges hémolysés par un sérum hémolytique est plus considérable si ces globules sont ajoutés en une seule fois, plutôt qu'à intervalles de temps assez longs, et par doses fractionnées.

En 1902, Danysz étudie la même réaction sur les toxines et leurs antitoxines, en particulier sur la toxine et l'antitoxine diphtériques. Il arrive à la même conclusion : une certaine quantité de toxine se montre plus active si elle est ajoutée à l'antitoxine par fractions, plutôt qu'en une seule fois.

Ce phénomène s'impose en faveur de la théorie de Bordet et n'est explicable que par l'adsorption de l'antitoxine par la toxine. Lorsqu'on ajoute la toxine en une seule fois, l'antitoxine se répartit également sur les molécules toxiques, elle les sature, partiellement peut-être, mais les rend inoffensives ; au contraire, si la toxine est ajoutée par doses fractionnées, les premières molécules toxiques introduites sont neutralisées, et les dernières ne touchent qu'une quantité inférieure d'antitoxine, le mélange toxine-antitoxine étant beaucoup plus stable qu'on ne le pense généralement. Il en résulte une toxicité terminale plus considérable que dans le premier cas.

Ce fait démontre que toxine et antitoxine s'unissent suivant des proportions variables.

RÉVERSIBILITÉ DU MÉLANGE TOXINE-ANTITOXINE

Si la nature du complexe toxine-antitoxine a nécessité bien des recherches, on s'est demandé aussi quelle était la stabilité de ce mélange. Les avis diffèrent sur ce point.

Autrefois, Ehrlich pensait que cette réaction était irréversible ; Madsen, au contraire, montrait qu'à partir du mélange toxine-antitoxine maintenu au contact du temps assez long, on peut, par des artifices spéciaux, obtenir isolément, la toxine, d'une part, et l'antitoxine, de l'autre.

Lui-même, et plus tard Walbum, firent l'expérience suivante : dans un tube contenant 10 cc. 5 de gélatine à 10 %, prise en gelée, ils ajoutent à la surface 2 centimètres cubes d'un mélange neutre toxine-antitoxine, qu'ils laissent 66 jours à la glacière. Ils libèrent le tube de gélatine, le lavent à l'eau physiologique. Le demi-centimètre cube supérieur contient un excès d'antitoxine, tandis que les 10 centimètres cubes inférieurs sont toxiques, pour le cobaye, à la dose de 5 centimètres cubes.

On possède aussi des moyens chimiques de dissocier le mélange toxine-antitoxine. Morgenroth et Villanen ont réussi, en employant l'acide chlorhydrique. Madsen et Schmidt ont obtenu le même effet avec l'iodure de sodium, et nombre d'autres substances chimiques diverses produisent un effet semblable.

Il semble donc bien, comme le disent Field et Teague, que la combinaison toxine-antitoxine représente non une réaction chimique vraie, mais l'adsorption d'un colloïde par un autre.

Ehrlich pensait que la réaction était immédiate ; au contraire, Arrhénius et Madsen assimilent cette action à celle d'un acide faible sur un alcool et, par conséquent, lente.

Il y a une chose certaine décrite par Morgenroth, c'est que l'injection immédiate dans les veines d'un

lapin, d'un mélange neutre toxine-antitoxine est toxique, tandis que l'injection sous-cutanée ne l'est pas. Morgenroth dit que dans le tissu cellulaire sous-cutané, la diffusion est très lente, et permet l'adsorption de l'antitoxine par la toxine, action qui s'exercerait *in situ*, ce qui ne peut avoir lieu par voie veineuse. Cela est à rapprocher de ce qu'observent Ionescu Mihaiesti et Damboviceanu : il faut deux heures à 37°, ou vingt-quatre heures à 20° pour que le mélange soit neutre.

Mais cela n'élucide pas la nature de la réaction toxine-antitoxine. Il est probable cependant qu'elle est, comme le dit Bordet, de nature physico-chimique et beaucoup plus stable qu'on ne le pense généralement. Ce n'est pas l'avis de Schmidt et Scholz, Lowenstein et Busson ; au contraire, Gorochownikowa pense que le mélange est très stable. Là encore, les divergences doivent venir de techniques, de conditions d'expériences différentes, qui prennent une valeur considérable, pour des éléments aussi complexes que la toxine et l'antitoxine.

LA FLOCCULATION DU MÉLANGE TOXINE-ANTITOXINE, LE PHÉNOMÈNE DE ZONE

Aperçue par Danysz avec la ricine et l'antiricine, Calmette et Massol, avec le venin de cobra et le sérum anticobraïque, M. Nicolle et Césari avec la toxine diphtérique et le sérum spécifique, la flocculation, étudiée par Ramon, en 1923, intéressa aussitôt tous les expérimentateurs, et fut le sujet de recherches nombreuses. Madsen et Schmidt, Moloney et Weld, confir-

mèrent l'accord étroit qui existe entre le titrage de Ramon et le titrage sur l'animal. Glenny et Okell, Glenny et Wallace, Schmidt, Nélis, Renaux, Zrodowski et Haliapine étudièrent les diverses influences qui modifient la floculation d'une toxine par son antitoxine. Partout l'avis fut unanime, qui reconnut cette réaction comme très importante dans le titrage des sérums et riche d'intérêt dans l'étude des relations toxine-antitoxine.

Ce furent Glenny et Okell, en 1924, qui définirent l'unité de floculation : la valeur Lf d'une toxine est la quantité de toxine déterminée par la floculation équivalente à 1 U.A. (une unité antitoxique standard). Cette valeur, qui est une fraction de centimètre cube, peut être adjointe à Lo, L+, Lr, disent-ils, pour réunir les propriétés de la toxine diphtérique.

Abt pense « qu'il est plus commode de noter, pour les toxines, le nombre d'unités toxiques par centimètre cube, exactement comme on note le nombre d'U.A. pour les sérums ».

Pour rechercher la valeur exacte de cette floculation, on a étudié les diverses influences qui peuvent la modifier. C'est ainsi qu'on s'est rendu compte de l'influence des électrolytes (Ramon, Schmidt) : le chlorure de sodium, notamment, retarde la floculation ; la température est optima à 39° ; la teneur en formol ne doit pas dépasser 5 % ; la nature chimique de la toxine a son importance, il ne faut pas qu'elle contienne plus de 1 % de NH_2 , titré par la méthode de Soëransen, disent Zrodowski et Haliapine. Ces auteurs trouvent d'ailleurs qu'une toxine riche en NH_2

se transforme difficilement en anatoxine. Enfin, l'âge de la toxine a été étudié par Ramon. Sur une anatoxine datant de cinq ans, cet auteur a retrouvé les mêmes propriétés exactement conservées, notamment le pouvoir de flocluler.

Toutes ces influences régissent la vitesse de flocculation ; celle-ci, même dans des conditions constantes et favorables, peut être très variables, d'une dizaine de minutes à plusieurs heures. Cette vitesse de flocculation traduit l'affinité du sérum pour la toxine, et elle est assimilable à « l'avidité » de ce même sérum, propriété décrite par Kraus.

Le pouvoir flocculant de la toxine a été rapproché, et avec raison, de ses autres pouvoirs (toxique, antigène) et le pouvoir flocculateur du sérum comparé à ses pouvoirs antitoxique et curateur. Les avis des expérimentateurs divergent souvent sur ces sujets ; il est probable que les techniques sont différentes et puis, aussi, on agit sur des éléments très complexes et difficilement comparables entre eux. Cependant, il est admis généralement que le pouvoir flocculant de la toxine apparaît au cours de sa formation, progressivement, et qu'il augmente jusqu'au dixième jour (Schmidt), pour rester ensuite stable pendant des années (Ramon). Il est d'abord parallèle au pouvoir toxique, puis s'en sépare progressivement à partir du septième ou huitième jour de végétation du bacille. Mais il n'y a pas de proportionnalité vraie, en ce sens, qu'une toxine flocculant bien, n'a pas absolument un pouvoir toxique élevé (Glenny et Okell, Glenny, Pope et Waddington). Le pouvoir antigène ou immunisant

n'est pas parallèle au pouvoir flocculant (Moloney et Beecher Weld), où il l'est au contraire (Zrodowski et Haliapine).

Quant au rôle flocculateur du sérum, les avis sont plus concordants. La vitesse de flocculation (l'avidité), variable suivant les sérums, reste la même chez un même individu, quelle que soit la valeur antitoxique de son sérum (Madsen et Schmidt, Moloney et Beecher Weld), mais elle est absolument parallèle à son pouvoir curateur (Glenny Pope et Waddington, Madsen et Schmidt). Nous avons vu qu'elle était influencée par les électrolytes, notamment par le chlorure de sodium.

On peut rapprocher la flocculation du « phénomène de zone ».

C'est encore Bordet qui, en 1899, a observé que la rapidité et l'importance de la réaction de précipitation sont variables avec la proportion du sérum précipitant. Camus, en 1901, étudiant la fibrinolyse accompagne le compte-rendu de son expérience de remarques précises : « Il est toujours avantageux de mettre en contact une grande quantité de sérum de l'animal immunisé (précipitine de notre terminologie) avec une petite quantité du liquide à étudier (précipitogène) ».

Mais c'est en 1907 que Fleischmann et Michaëlis énoncent véritablement les lois qui régissent le phénomène.

— Pour une quantité donnée de précipitogène, la masse de précipité est proportionnelle à la quantité de précipitine,

— Si l'on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressives de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement, puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène,

— Pour des quantités constantes des deux réactifs, la quantité de précipité obtenue est inversement proportionnelle au volume de liquide utilisé dans la réaction.

Purification de la toxine, moyens employés

Les milieux synthétiques

La nature même de la toxine diphtérique reste ignorée. Celle-ci ne peut être abordée qu'en étudiant une toxine purifiée, car l'analyse n'est pas possible sur une toxine totale, telle qu'elle est issue de la végétation en voile du bacille diphtérique sur le bouillon Martin, *seul milieu donnant une toxine active et constante dans ses effets* avec un microbe toxigène. Nous ignorons, en effet, la composition exacte du bouillon, tant en protides qu'en cristalloïdes et en corps organiques divers. Signalons, cependant, les essais d'analyse chimique du bouillon, poursuivis par Abt et Loiseau. On pourrait essayer de tourner la difficulté en utilisant un milieu de culture de nature strictement définie, mais là, on se heurte à une difficulté primordiale : c'est la végétation insuffisante du bacille. Dès 1892, Guinochet, dans le but d'élucider la nature chimique de la toxine, fait des essais de culture du bacille diphtérique sur des milieux sans albumine. Pour cela, il se sert d'urine et obtient une toxine ; il conclut que cette toxine, formée au sein d'un milieu sans albumine, n'est pas elle-même une albumine.

Plus tard, Gamaléia compose ainsi un milieu sans albumine :

Extrait Liebig	0 gr. 50
Glycérine	4 gr.
Sel	0 gr. 50
Eau	100 cc.

En 1893, Ouchinsky, dans une étude sur la nature du poison diphtérique indique ce milieu :

Eau	1000 cc.
Glycérine	40 à 50 gr.
Chlorure de Na.....	5 à 7 gr.
Lactate d'Am	10 gr.
Chlorure de Ca.....	0 gr. 10
Sulfate de Mg.....	0 gr. 20
Biphosphate de K.....	1 gr.

Dans la suite il ajoute :

Urée	5 gr.
Acide urique	0 gr. 02
Sucre de canne.....	5 à 10 gr.

et prétend que le lactate d'Am est indispensable.

Les cultures sont plus longues, pour être moins toxiques, que celles faites au bouillon de viande peptoné.

Ultérieurement, ce milieu est employé par Hadley et Gorham, qui l'enrichissent de glycocolle, et en 16 jours obtiennent une toxine active. Il est simplifié par Von Groër, qui le réduit à :

Lactate d'Am	10 gr.
Phosphate bicalcique	1 gr
Chlorure de Na.....	10 gr.
Glycérine	15 gr.
Eau	1.000 cc.

Récemment, Braün et Holmeier, Braün et Mündel, ont montré que la cystine était indispensable au développement du bacille diphtérique, et Wadsworth et Mary Wheeler ont reconnu que ce bacille pousse normalement et produit une toxine lorsqu'il est cultivé

sur un milieu synthétique contenant des chlorures, des sulfates et des phosphates de sodium, de calcium, de magnésium, du glucose et de la peptone. Enfin, l'addition du phosphate de calcium à un milieu sans peptone favorise la production de la toxine.

J. Courmont et A. Morel, qui ont beaucoup étudié la culture des bactéries sur milieux chimiquement définis, n'ont pas abordé la question de la végétation du bacille diphtérique.

Malgré tous ces essais et le perfectionnement de ces milieux, la culture est toujours lente et pauvre en toxine ; celle-ci reste difficile à étudier. Dès lors, il paraît plus simple d'essayer de saisir la toxine elle-même lorsqu'elle s'est concentrée dans un milieu riche et particulièrement adapté à la végétation du bacille. C'est le but qu'ont poursuivi les auteurs, en précipitant, par des agents chimiques, la toxine de son milieu complexe.

Précipitation de la toxine par des agents chimiques

Roux et Yersin ont montré que la toxine était entraînée dans le précipité de phosphate de calcium, obtenu en ajoutant, goutte à goutte, du chlorure de calcium au liquide de culture filtré. Cette technique a été encore récemment suivie par Abt. Mais la toxine doit alors être dialysée pour être pure et nous verrons que la dialyse modifie considérablement les propriétés

du produit obtenu. D'autre part, la technique n'apparaît pas simple et comporte des manipulations telles qu'elles entraînent fatalement des pertes relativement considérables. Les mêmes objections peuvent s'adresser à la technique de Gessard et Loiseau, qui se servent du chlorure de calcium et du phosphate disodique. Ces entraînements de la toxine par adsorption rappellent les essais tentés en vue de la séparation élective des ferments solubles, tels que les ferments du suc pancréatique. Récemment, Bocquet vient d'utiliser, dans le même ordre d'idées, le charbon à grains fins et a constaté l'adsorption nette de la toxine diphtérique, qui devient inoffensive, mais semble aussi avoir perdu ses propriétés immunisantes.

Roux et Yersin ont tenté aussi la précipitation par le chlorure d'aluminium ; il se fait un précipité gélatineux, qui ne contient que très peu de toxine.

En 1890, Brieger et Fraenkel, obtinrent par l'alcool un précipité, ne contenant qu'un faible pourcentage de toxine. Ces essais furent renouvelés, en 1920, par Banzhaf.

En 1893, Ouchinsky fait l'essai de diverses substances, le sulfate de magnésium, le sulfate de soude, le chlorure de sodium, qui ne donnent aucun précipité. L'acétate de plomb, le sublimé, donnent un précipité, mais l'auteur étudie spécialement l'action de l'alcool : le précipité est toxique et présente une très faible réaction albuminoïde, de plus, il se dissout dans l'alcool ; l'auteur en conclut que la toxine appartient au groupe des corps albuminoïdes.

L'action des acides sur la toxine diphtérique avait été amorcée par Roux et Yersin qui, lors de leurs mémorables travaux, avaient observé la baisse du pouvoir toxique par adjonction d'un acide, lactique

ou tartrique, en faible quantité, avec récupération complète de ce pouvoir par alcalinisation. Ce n'est qu'en 1908 que Doerr observa la même chute du pouvoir toxique, par addition d'acide chlorhydrique, avec réversibilité du phénomène. Ni l'un ni l'autre de ces expérimentateurs ne relate la formation d'un précipité par acidification. C'est en 1915 que Glenney et Walpole dialysent de la toxine sous pression, puis lui ajoutent de l'acide acétique dilué. Watson et Wallace, en 1924, précipitent par l'acide acétique à dose élevée (1 à 3 %). Leurs travaux sont d'ailleurs postérieurs à ceux de Von Groër ; cet auteur a vu que l'addition de 2 cc. 5 de HCL N/10 à 5 centimètres cubes de toxine donne un précipité contenant les propriétés toxiques du bouillon.

Enfin, récemment, Hosoya et Mixata, en vue d'étudier la nature de la toxine, isolent imparfaitement le principe toxique par une série de manipulations complexes, au moyen de substances chimiques (chlorure de zinc et citrate d'Am) et d'une dialyse.

Précipitation de la toxine par abaissement du pH à 4,7

Nous avons cherché à nous rendre compte de l'influence de l'abaissement du pH sur la toxine diphtérique, appliquant à cette étude le même principe qui avait conduit MM. Sédallian et Loiseleur pour fragmenter les sérums et rechercher dans quelle fraction des albumines précipitées se trouve le principe antitoxique. On sait que les protéines ont un point isoélectrique, étudié dans les belles recherches de Loeb ; à ce point isoélectrique, les colloïdes sont dans l'état instable qui leur permet de flocculer le plus aisément. Rewsky pense, au contraire, que le point de précipitation avec toxicité maximum ne doit pas être considéré comme le point isoélectrique de la toxine.

Nous avons montré (1) que la précipitation de la toxine diphtérique se faisait à pH 4, 7, et que l'isolement était pratiquement total. Nous avons utilisé

(1) *C. R. S. Biol.*, 1927, 97, 93 ; *C. R. S. Biol.*, 1927, 97, 1543 ; *C. R. S. Biol.*, 1928, 99, 1746 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, 679. — *C. R. Acad. des Sciences*, 1927, 185, 902 ; *C. R. Acad. des Sciences*, 1928, 187, 1297. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, II, 413-436.

la toxine provenant de la végétation en voile pendant sept jours du bacille AM 7 de Park et Williams, sur bouillon Martin. Si, à cette culture filtrée, on ajoute un acide, on voit qu'à pH 4, 7, apparaît aussitôt une opalescence et, en une heure ou deux, on voit des grumeaux qui se déposent, en six à huit heures, au fond du vase.

La nature de l'acide (HCL ou CH^3COOH) n'intervient pas et ne modifie pas les résultats expérimentaux. A. des pH supérieurs à 4,7 il n'apparaît pas de floculation, contrairement à ce qui se passe à des pH inférieurs, comme l'avait vu Von Groër ; cet auteur avait pensé que la précipitation se produisait suivant une zone assez large. Mais il se dépose alors des albumines banales et l'hyperacidification n'est pas sans influencer la puissance toxique du produit obtenu (1). Enfin, ce précipité n'est pas soluble dans un excès d'acide.

La séparation rapide de ce flocculat par une centrifugation prolongée est nécessaire si l'on veut aboutir à un produit actif n'ayant rien perdu de sa toxicité première. La toxicité s'affaiblit, en effet, en milieu acide, comme l'avaient prouvé Roux et Yersin, dès le début de leurs mémorables travaux. C'est pourquoi le contact acide ne peut, sans un certain inconvénient, être prolongé plus de quatre heures, le précipité

(1) KOULIKOFF et SMIRNOFF, dans des travaux très récents disent que la toxine diphtérique précipite à pH 4,8 et confirment que l'adjonction d'acide augmente le précipité sans augmenter la valeur toxique.

n'augmente d'ailleurs pas avec le temps (1). La centrifugation à grande vitesse, pendant longtemps, n'est pas moins nécessaire et c'est sa plus ou moins parfaite réalisation qui rend compte des variations observées dans la toxicité du flocculat. Dans les cas où la toxine a été insuffisamment centrifugée, le liquide surnageant donne encore des escarres aux cobayes, auxquels on l'injecte à haute dose, tandis qu'il est normalement inoffensif. En outre, on aura soin de se tenir à basse température (Watson et Wallace).

Lorsqu'on se place dans des conditions qui peuvent être considérées comme défectueuses : attente prolongée, insuffisante centrifugation, on obtient cependant 80 % de la toxicité primitive. Dans de bonnes conditions, on atteint 95 %, ou parfois 100 %, avec une simple différence dans le temps de survie des cobayes inoculés avec la dose minima mortelle. Ainsi, une toxine tuant à 1/400^e de centimètre cube en trois jours donne un précipité qui, alcalinisé et ramené au volume primitif de la toxine, dont il est issu, tue à 1/400^e en cinq à six jours (2).

Du reste, nous n'avons pas cherché à obtenir une hypertoxine, destinée à servir à un vaccin plus concentré ou désalbuminé, comme cela semble avoir été

(1) D'après IONESCO, MIHAILESTI et DAMBOVICEANU (*Archives Roumaines de Biologie*, t. I, n° 1, janvier 1928, p. 118). — La destruction de la toxine diphtérique par les acides ne se produit qu'à des pH inférieurs à 4,7 et après les 30 premières minutes.

(2) Nous avons toujours recherché la dose Lmn, et nous ne faisons pas intervenir dans nos titres de toxicité, les œdèmes ou les escarres, ni la dose Lr, des auteurs anglais.

la préoccupation de beaucoup d'auteurs, mais à étudier, par l'analyse chimique et l'analyse biologique, ce produit qui concentre les propriétés immédiatement toxiques de la toxine diphtérique. Nous avons des raisons de le considérer comme étant une toxine aussi purifiée que le permettent les moyens techniques actuels.

Etude chimique de la toxine précipitée

La nature chimique de la toxine est loin d'être parfaitement élucidée. En 1880-90, Roux et Yersin en faisaient une diastase, parce qu'elle en présente les propriétés, et agit comme celle-ci, à doses infinitésimales. Plus tard Oppenheimer, se rallia encore à cette opinion. Il est cependant vraisemblable que la toxine doit être de nature albuminoïde ; c'est ce que pensaient Brieger et Fraenkel, Wassermann et Proskauer, et déjà en 1892, Gamaléia étudiait l'action des ferments protéolytiques sur la toxine, dans l'espoir d'élucider ce problème. A la suite de cette étude, il arrive à cette notion, que le poison diphtérique est une nucléo-albumine, parce que, après avoir fait agir la trypsine et la pepsine sur le bouillon, il reste un poison cachectisant, qui résiste à leur action dissolvante, et il assimile ce corps à une nucléine. « Cette constitution, dit-il, expliquerait, non seulement, les réactions de ce poison envers les ferments digestifs, mais aussi, son instabilité et sa provenance évidente des corps bacillaires, constitués par des noyaux. »

Il nous était relativement plus facile de nous rendre compte de la nature du flocculat toxique que de celle d'une toxine dispersée en petite quantité au sein d'un bouillon complexe.

La substance, que nous isolons après centrifugation, est amorphe et de teinte grise plus ou moins foncée, parfois elle est un peu rougeâtre. Elle renferme une forte proportion d'eau, variant de 90 à 95 %. En général, un litre de bouillon toxique laisse un poids de flocculat sec, variant entre 120 et 200 milligrammes. Calciné, il laisse 0,88 % de cendres et renferme 0,035 de chlorures, exprimés en chlorure de sodium, perdus d'ailleurs par dialyse. La toxine fraîche précipitée, insoluble dans l'eau ou les acides, le devient facilement par addition de traces de soude et reprécipite de sa solution alcaline, par addition d'un acide minéral ou organique. La solution donne faiblement la réaction du biuret. Peut-être faut-il attribuer cette réaction à des traces de peptone entraînée.

Cette solubilité dans les alcalis est un des caractères des nucléoprotéides. Mais ceux-ci renferment du phosphore qui est un de leurs constituants spécifiques. Pour le doser dans le flocculat, nous avons minéralisé celui-ci, soit par la méthode azotosulfurique, soit par le mélange sulfoperchlorique préconisé par Lematte, Boinot et Kahane. Le dosage lui-même a été effectué suivant la technique de Neumann ou de Macheboëuf.

Nous avons trouvé les chiffres ci-après de phosphore pour cent de toxine sèche recueillie à différents jours : 0 gr. 42, 1 gr. 13, 0 gr. 67, 1 gr. 25 et 1 gr. 40.

Lorsque le bacille a été cultivé sur un bouillon renfermant du nucléinate de soude, qui ne se montre pas toxique, on obtient un précipité plus riche en phosphore puisque le taux s'en élève à 2 gr. 02 pour cent de toxine sèche.

Le flocculat renferme donc des nucléoprotéides, dont la teneur en phosphore peut varier entre 0,50 et 1,50 %, d'après Lambling, et se tient aux environs de 1 %, d'après Hugounenq. Ces résultats infirment ceux de Watson et Langstaff qui, dans un étude chimique du flocculat, ne trouvent que d'une façon inconstante du phosphore.

Restait à tenter un essai de digestion pepsique. Nous avons laissé pendant vingt-quatre heures, à l'étuve à 37°, 2 grammes de flocculat acétique frais, provenant de 1 litre 300 de bouillon toxique, dans un mélange formé de 0 gr. 20 de pepsine, 1 gramme d'acide chlorhydrique et 100 grammes d'eau. La solubilisation est incomplète et il reste un résidu rouge brun qui, après minéralisation convenable, donne abondamment et nettement les réactions caractéristiques du phosphore.

Etude biologique de la toxine précipitée

LE POUVOIR TOXIQUE, DOSE MINIMA MORTELLE (Lmn), DIALYSE

Comme nous l'avons dit antérieurement, la dose toxique de la substance précipitée est, à peu de choses près, égale à celle de la toxine primitive, dont elle est issue ; cette toxicité étant recherchée avec une solution alcalinisée de ce flocculat, de volume égal à celui de la toxine primitive.

A doses correspondantes, on ne trouve qu'un retard

dans le temps de survie des cobayes injectés. C'est ainsi qu'une toxine tuant au $1/400^e$ en trois jours, donne un précipité qui, ramené au volume primitif et alcalinisé convenablement, tue à la même dose en cinq à six jours.

Mais si, au lieu de diluer ce flocculat dans l'eau distillée ou dans l'eau physiologique, on le dilue dans du bouillon Martin simple, n'ayant pas encore servi à la végétation du bacille, on constate que la toxicité est accrue et égale à la toxicité de la toxine primitive.

L'expérience suivante montre les résultats de toxicité comparée :

Lmn toxine totale, $1/400$ en trois jours, cobaye de 250 grammes ;

Lmn toxine flocculée, dissoute en eau, $1/380$ en trois jours, cobaye de 250 grammes ;

Lmn toxine flocculée dissoute en bouillon Martin $1/400$ en quatre jours, cobaye de 250 grammes (voir graphique p. 56).

Cette expérience est d'ailleurs à rapprocher des constatations de Walbum, qui a vu la toxicité d'une toxine augmenter, lorsque la dilution est faite dans du bouillon et non dans de l'eau.

Le liquide aqueux, où le précipité a été remis en solution alcaline, conservé plusieurs semaines à la température du laboratoire, voit sa toxicité baisser plus vite que ne baisse généralement celle d'une toxine ordinaire. Mais cette toxicité se maintient beaucoup plus rigoureusement, si le liquide est conservé dans du bouillon Martin ou en présence de peptone.

Ainsi, le bouillon apporte un élément de stabilité à la toxine, élément qui lui manque, dans les solutions aqueuses de toxine précipitée. Il joue, dans la toxicité recherchée *in vivo*, le rôle d'une substance favorisante, ou bien celui d'une substance protectrice à la lyse d'une fraction de cette toxine, lorsqu'elle est introduite dans les tissus.

La stabilité de la toxine est donc vraisemblablement maintenue par les *substances peptonées*, qui jouent, pour elle, le rôle de *colloïde protecteur*.

De ces recherches, il nous semble permis de conclure que le floculat, recueilli par acidification et centrifugation de la toxine, est formé par des *nucléo-protéïdes*. Constituent-ils la toxine proprement dite ou celle-ci est-elle adsorbée par eux ? C'est une question qui appelle de nouvelles recherches. Cependant, il convient d'insister sur ce fait, que les substances isolées représentent seulement 120 à 200 milligrammes de matières sèches, chiffre bien peu considérable si l'on songe aux taux de protides renfermés dans un litre de bouillon Martin.

Roux et Yersin ont montré, les premiers, que la dialyse fait disparaître le pouvoir toxique de la toxine diphtérique totale. Dans un article très récent de Abt, on trouve l'énoncé d'expériences confirmatives, réalisées avec une toxine précipitée par le phosphate de calcium.

Glenny et Walpole dialysent aussi une toxine obtenue par précipitation acide. Nélis, en 1926, dit que la toxine diphtérique dialyse peu et lentement à travers le collodion ; de cette façon, elle perd rapidement son pouvoir toxique ; mais l'atténuation complète ne peut s'obtenir que par un séjour prolongé à l'étuve.

Enfin, Sbarsky et Nikolaeff, dans une série d'essais de dialyse, remarquent, que le produit toxique dialyse. Ils pensent, que celui-ci se fixe sur les acides aminés, car ces substances accélèrent la dialyse.

Lorsque le flocculat, mis en suspension dans l'eau distillée, est soumis à la dialyse en sac de collodion, on constate après une dialyse de six jours que le taux de ses cendres a diminué et qu'il ne renferme plus que des traces inappréciables de chlorures. Par contre, le taux du phosphore reste pour ainsi dire identique et on n'en retrouve pas dans le dialysat. Voici, en effet, ce que nous avons noté pour cent de substances sèches :

	<i>Cendres</i>	<i>NACL</i>	<i>P² O⁵</i>
Toxine fraîche	0,88	0,035	2,73
Toxine dialysée	0,63	0	2,47

Mais, le fait le plus remarquable, c'est que la dialyse modifie considérablement le pouvoir toxique. Si tous les deux jours environ on prélève dans le dialysateur un échantillon finement émulsionné et que l'on injecte le mélange à des cobayes, en tenant compte des variations de volume que la dialyse a pu entraîner, on constate un abaissement de toxicité par comparaison avec un flocculat identique, non soumis à la dialyse. Sans doute, la toxicité des deux flocculats baisse (voir p. 45), mais celle du produit dialysé s'atténue plus rapidement pour devenir nulle après un temps plus ou moins long, six à vingt jours.

Voici les résultats obtenus dans deux séries d'expériences :

Toxine floclée par H Cl

	Doses injectées (1).		Durée de la survie (2)	
	Emulsion de 0g,432 de toxine dans 10 cm ³ d'eau.		Toxine témoin	Toxine soumise à la dialyse.
1 ^{er} jour ...	$\frac{1}{1000}$ de cm ³		4 jours	4 jours
2 ^e » ...	$\frac{1}{100}$ »		3 jours	définitive
	$\frac{1}{10}$ »		48 heures	3 jours
	$\frac{1}{10}$ »		46 heures	3 jours
5 ^e » ...	$\frac{1}{10}$ »		30 heures	définitive
	$\frac{1}{2}$ »		15 heures	définitive

Autre toxine floclée par CH³ COOH.

	Doses injectées (1).		Durée de la survie (2)	
	Emulsion de 0g,432 de toxine dans 10 cm ³ d'eau.		Toxine témoin	Toxine soumise à la dialyse
1 ^{er} jour ...	$\frac{1}{1000}$ de cm ³		24 heures	24 heures
2 ^e » ...	$\frac{1}{500}$ »		48 heures	3 jours
	$\frac{1}{100}$ »		20 heures	2 jours
	$\frac{1}{10}$ »		20 heures	20 heures
3 ^e » ...	$\frac{1}{100}$ »		48 heures	définitive
	$\frac{1}{10}$ »		16 heures	48 heures
5 ^e » ...	$\frac{1}{10}$ »		4 jours	définitive
	$\frac{1}{2}$ »		20 heures	définitive

(1) Les toxines floclées ont été ramenées à pH = 7 avant injection, ce qui provoque une solubilisation parfaite.

(2) Cobayes de 250.

On savait déjà qu'une toxine acidifiée perdait son pouvoir toxique et que la toxine diphtérique ne se forme pas en milieu acide. Mais on ne peut attribuer à l'acidification seule la perte du pouvoir toxique de la toxine soumise à la dialyse, qui a justement pour effet de la débarrasser des acides qui ont servi à la précipiter. Tout semble se passer comme si la dialyse enlevait une substance cristalloïde nécessaire à la manifestation du pouvoir toxique.

LE POUVOIR IMMUNISANT, ESSAIS DE VACCINATION, ACTION DU FORMOL, ACTION DES SAVONS

Nous avons recherché le pouvoir immunisant des substances isolées en étudiant comparativement :

1° La toxine floculée, dissoute dans un volume convenable d'eau distillée ou d'eau physiologique ;

2° Cette même toxine dissoute dans du bouillon Martin pur ou dilué à des taux divers ;

3° Cette même toxine, dissoute dans de l'eau gélatinée ;

4° Cette même toxine, dissoute dans de l'eau peptonée à des taux variables ;

5° Le liquide surnageant.

chacun de ces produits étant atténué par l'action combinée du formol et de la chaleur (quarante-huit heures à 50° ou vingt jours à 37°), et étudié chaque fois, par comparaison avec la même toxine totale, qui a servi à les préparer.

Nous avons réalisé plus de quatre cents expériences. Les animaux sur lesquels l'immunité est recherchée sont des cobayes de 250 à 500 grammes. Ils sont sou-

mis à deux ou trois injections, faites à huit jours d'intervalle, aux doses de 1 cc. ou 1 cc. 5 (dose calculée d'après le volume de la toxine témoin). L'intervalle entre la dernière injection de vaccin et l'injection de toxine pure d'épreuve est de trente à quarante-cinq jours. La dose de toxine pure, injectée pour éprouver l'immunité, est de 50 Lmn au minimum.

a) *Vaccination avec la toxine totale (anatoxine).* — Comme on le sait déjà, depuis les expériences de Ramon, cette vaccination est toujours efficace. L'immunité insuffisante ne s'observe qu'avec des animaux n'ayant pas reçu trois injections d'anatoxine.

b) *Vaccination avec le flocculat dissous dans de l'eau alcalinisée.* — Elle ne donne une immunité suffisante que dans un sixième des cas.

c) *Vaccination avec du flocculat dissous dans du bouillon Martin.* — Elle donne l'immunité dans tous les cas, comme l'anatoxine pure, préparée avec la toxine totale.

d) *Vaccination avec du flocculat dissous dans l'eau avec peptone du commerce.* — Elle ne donne l'immunité que dans la moitié des cas, et à la condition que la peptone soit au taux de 2 % au moins dans la solution.

e) *Vaccination avec le flocculat, dissous dans de l'eau gélatinée à 2 ou 3 %.* — Elle donne une immunité dans les deux tiers des cas.

Devant ce résultat donné par la gélatine, nous avons essayé l'action du glyocolle, dissous à la dose de 4 % dans l'eau qui avait repris le flocculat. Les résultats obtenus dans la recherche de l'immunité présen-

tent quelque intérêt, mais sont trop inconstants pour que nous puissions en faire mention ici. Nous faisons de nouveaux essais avec le glycocolle et même différents acides aminés.

f) *Vaccination avec le liquide surnageant.* — Elle ne donne jamais d'immunité.

Ainsi, le précipité obtenu dans nos expériences possède les propriétés immunisantes de la toxine, dont il dérive. Mais ses propriétés ne gardent leur stabilité et ne sont révélées à l'épreuve de la vaccination que s'il est dissous dans un liquide (peptoné ou gélatiné) et ces substances, selon toute vraisemblance, jouent, par rapport à ces propriétés, le rôle d'un colloïde protecteur.

La précipitation par les acides, non plus de la toxine active, mais d'une anatoxine vieillie, ne donne point les mêmes résultats que ci-dessus, si nous en croyons les expériences de Ramon, faites d'ailleurs par abaissement à un pH très bas (pH 4), ce qui peut modifier considérablement les propriétés du produit par précipitation de protéines banales.

Il est cependant exact que la précipitation de l'anatoxine, comme nous l'avons signalé dès notre première note, n'entraîne qu'un très faible précipité. Aussi bien, il est vraisemblable, comme l'avait senti Ehrlich, qu'au cours de la formation des toxoïdes un long processus de transformation s'effectue. Il nous paraît possible que ce processus soit une adaptation plus étroite entre les nucléo-protéides toxiques *actifs* et les colloïdes *non spécifiques* du milieu, aboutissant à un complexe plus stable, dans lequel l'acidi-

fication à pH 4,7 ne précipite plus, ou presque plus, de substance utile.

Lowenstein s'est servi du formol pour atténuer la toxicité des toxines. Ramon, en utilisant le formol et la chaleur est parvenu à obtenir une toxine diphtérique atoxique, mais ayant conservé son pouvoir immunisant. L'action du formol conjuguée avec celle d'une chaleur modérée permet donc la dissociation de l'action toxique et de l'action immunisante. Plus récemment, Nélis, Glenny, Barbara et Hopkin ont étudié l'action du formol. On admet, par analogie avec son action sur les aminoacides, que le formol agit en bloquant les fonctions NH^2 de la toxine.

Nous avons essayé l'action de ce corps sur la toxine isolée de son milieu complexe : le formol devant agir sur elle plus directement et suivant un mécanisme plus accessible à l'observation. Nous avons d'abord suivi à l'aide de la méthode de Bougault et Gros la fixation du formol sur les protéines floculées. Pour cela, la toxine était laissée en contact à froid avec 25 centimètres cubes de solution aqueuse de formaldéhyde, de titre variant entre 1,80 et 2,20 pour 1.000, les prises d'essai de toxine fraîche étant de 1,049, 1,150 et 2,610. Dans les trois cas, il nous a été impossible de déceler au dosage une diminution nette de la teneur en formol de la solution aldéhydique. Sans doute, les quantités fixées étaient trop faibles pour être saisies analytiquement. Mais il est chose digne de remarque : c'est que, si l'on prolonge pendant un mois, à la température du laboratoire, l'action du formol dilué sur la toxine floculée, celle-ci devient insoluble dans les

solutions alcalines étendues et perd tout pouvoir toxique, comme aussi toute propriété immunisante. A chaud, on observe la même inactivation totale et le flocculat est pour ainsi dire « bakélisé ».

Si on essaye de suivre à intervalles rapprochés : trois, quatre, cinq et six jours, l'action destructive du formol, alors que la toxine est encore partiellement soluble dans les alcalis, on aboutit aux mêmes résultats négatifs. Il semble donc qu'agissant directement sur la toxine, le formol ait une action toute différente de celle que l'on observe, lorsqu'il agit sur cette même substance en solution dans un milieu riche en protides. Dans nos expériences on ne pouvait attribuer son action néfaste soit à une concentration exagérée de la solution de formaldéhyde, soit à un chauffage exagéré, puisqu'elle s'observe à froid avec des solutions à 2 pour 1.000, doses qui sont signalées comme ayant une action peu marquée sur la toxicité. Il nous a donc paru logique de rechercher si la toxine n'était pas protégée, du moins partiellement, par une substance normalement en solution dans le bouillon. Pour cela, nous avons fait agir le formol sur la toxine remise en solution dans de l'eau peptonée, dans l'eau gélatinée et dans le bouillon Martin lui-même. Dans tous les cas, on voit la toxicité s'atténuer sous l'action de doses convenables de formol et d'une chaleur modérée. Bien plus, le mélange devenu atoxique acquiert des propriétés immunisantes, comme il a été démontré plus haut. Une conclusion découle logiquement de ces constatations expérimentales. Le formol agissant sur une toxine purifiée, la transforme chimiquement

et physiquement, au point de lui faire perdre toutes ses propriétés caractéristiques. La production d'anatoxine n'est possible que s'il existe une substance protectrice jouant *un rôle intermédiaire nécessaire* entre le formol et la toxine elle-même.

Reprenant les travaux de H. Vincent sur les « cryptotoxines », avec notre toxine purifiée, nous avons fait quelques essais d'atténuation. Nous nous sommes bornés à l'expérience d'orientation, qui avait pour but d'étudier comparativement l'action des savons sur la toxine totale, la toxine floculée dissoute en eau et la toxine floculée dissoute en bouillon Martin. Nous nous sommes rendu compte que l'action des savons était beaucoup plus active sur le flocculat dissous en eau que sur le flocculat dissous en bouillon Martin ou la toxine totale.

Nous nous réservons de faire d'autres expériences sur ce sujet.

LE POUVOIR DE FIXER L'ANTITOXINE LE POUVOIR ADSORBANT

Nous l'avons recherché par deux groupes d'expériences :

1° En titrant la dose limite mortelle (L +) des différents fragments de la toxine ;

2° En mettant en contact, avec ces fragments, de l'antitoxine en excès, et en recherchant, par double titrage, la quantité d'antitoxine restante : a) par rapport à une dose fixe de toxine totale préalablement diluée, les doses d'antitoxine étant variables ; b) la dose

d'antitoxine contenue dans le mélange étant fixe, les doses de toxine avec lesquelles elle est mise en contact étant variables.

Toutes ces expériences sont concordantes.

I. — *Dose limite mortelle* (L +). — La dose limite mortelle du flocculat dissous dans l'eau est notablement inférieure à celle de la toxine, quoique toute la toxicité de cette dernière soit retrouvée dans le flocculat. Mais la dissolution de ce flocculat dans du bouillon peptoné, augmente notablement sa propriété adsorbante, comme le montrent les tableaux suivants, où sont inscrites, pour chaque substance en épreuve, la dose minima mortelle (Lmn) et la dose limite mortelle (L +) (1).

	Lmn	L +
Toxine totale	1/400	0,25
Flocculat dissous dans un volume d'eau égal au volume primitif de la toxine totale dont il est issu.....	1/380	1,4
Flocculat dissous dans un volume de bouillon Martin égal au volume primitif de la toxine totale dont il est issu.....	1/400	0,6
Liquide surnageant, obtenu après centrifugation	< 5 cc.	

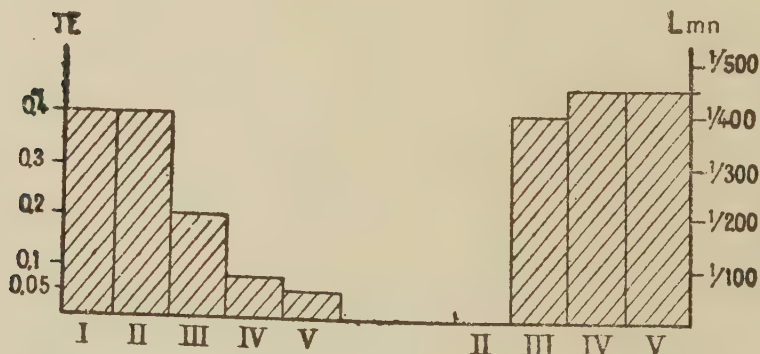
Voici d'autres expériences :

	Lmn	L +	Lmn	L +
Toxine totale	1/500	0,09	1/500	0,08
Flocculat en eau	1/500	1,2	1/500	0,4
Flocculat en bouillon Martin	1/500	0,3	1/500	0,15

(1) Nous nous sommes servi des sérums préparés au laboratoire (sérums de chevaux) dont le taux d'U. A. est de 1/350 à 1/500 d'U. A. Erhlich, titrées par rapport au sérum étalon du laboratoire de Washington.

Cette disproportion entre L_{mn} et $L + n$ n'est pas anormale. Elle est conforme aux anciennes expériences d'Erhlich, prouvant la constance du même pouvoir de fixation de l'antitoxine, malgré l'atténuation de la toxicité pour une toxine donnée. (Voir p. 20.)

II. — Les résultats de la deuxième série d'expériences de pouvoir adsorbant sont concordants entre eux. Nous représentons, avec le diagramme suivant la quantité de toxine totale étalon, susceptible d'être neutralisée par une dilution de sérum titré, mise en présence, dans quatre expériences parallèles avec : a) une même dose de toxine totale ; b) une même dose de flocculat, issu de cette toxine et dissous dans un volume convenable d'eau ; c) une même dose de flocculat, issu de cette toxine et dissous dans un volume convenable de bouillon Martin ; d) une même dose de liquide surnageant.



On représente par une colonne, à gauche, la dose de toxine étalon (TE), susceptible d'être neutralisée par une dilution de sérum qui a été mise en contact avec :

1° De l'eau pour figurer la dose neutralisante de la dilution témoin ;

2° Du liquide surnageant ;

3° Du flocculat dissous dans l'eau ;

4° Du flocculat dissous dans le bouillon Martin ;

5° De la toxine totale.

On figure, à droite, le pouvoir toxique Lmn des différentes substances étudiées.

On constate les faits suivants :

Le liquide surnageant ne fixe pas d'antitoxine ;

Le flocculat n'en fixe qu'une faible partie ;

Le flocculat dissous en bouillon Martin fixe légèrement moins d'antitoxine, mais presque autant, que la toxine totale étudiée.

Il existe donc, dans le bouillon Martin seul, n'ayant pas encore servi à la végétation du bacille, des substances, non spécifiques, mais qui, en présence du flocculat préparé à partir de la toxine, lui confèrent des propriétés adsorbantes, que le flocculat seul ne possède pas.

FLOCCULATION T. A.

Nous avons fait quelques essais de flocculation du mélange toxine-antitoxine avec la toxine purifiée en mettant, dans des épreuves parallèles, l'antitoxine en contact avec les liquides suivants :

La toxine témoin (toxine totale) ;

Le précipité obtenu par acidification à pH 4,7 et mis en solution dans de l'eau salée à 9 pour 1.000 (volume égal à celui de la toxine primitive) ;

Ce même flocculat dissous dans un volume correspondant de bouillon Martin ;

Le liquide surnageant neutralisé ;
tous ces liquides étant formolés.

Nos essais portent sur un petit nombre d'expériences :

1° Le liquide obtenu par dissolution du flocculat dans de l'eau salée, donne, avec un sérum antidiphthérique, une flocculation assez intense, mais difficile à juger, car son intensité est parallèle aux quantités de sérum utilisées, et ne s'établit pas dans les limites d'une zone, comme la flocculation spécifique. Ce résultat ne peut pas permettre ici de préjuger du non pouvoir immunisant de ce liquide.

2° Le liquide surnageant neutralisé, donne parfois, inconstamment, une flocculation très légère et égale dans tous les tubes, et ceci, malgré l'absence de tout autre propriété spécifique constatée dans ce liquide.

3° Le flocculat neutralisé et dissous en bouillon Martin, floccule dans une zone superposable à celle de la toxine totale témoin. La « vitesse de flocculation » est cependant moins grande et l'intensité du flocculat moins considérable que dans les tubes témoins.

Ces quelques expériences font penser, que, dans le phénomène de flocculation T. A., interviennent, à côté de la toxine proprement dite, des éléments non spécifiques, répartis, soit dans le bouillon Martin ordinaire, soit dans le liquide surnageant.

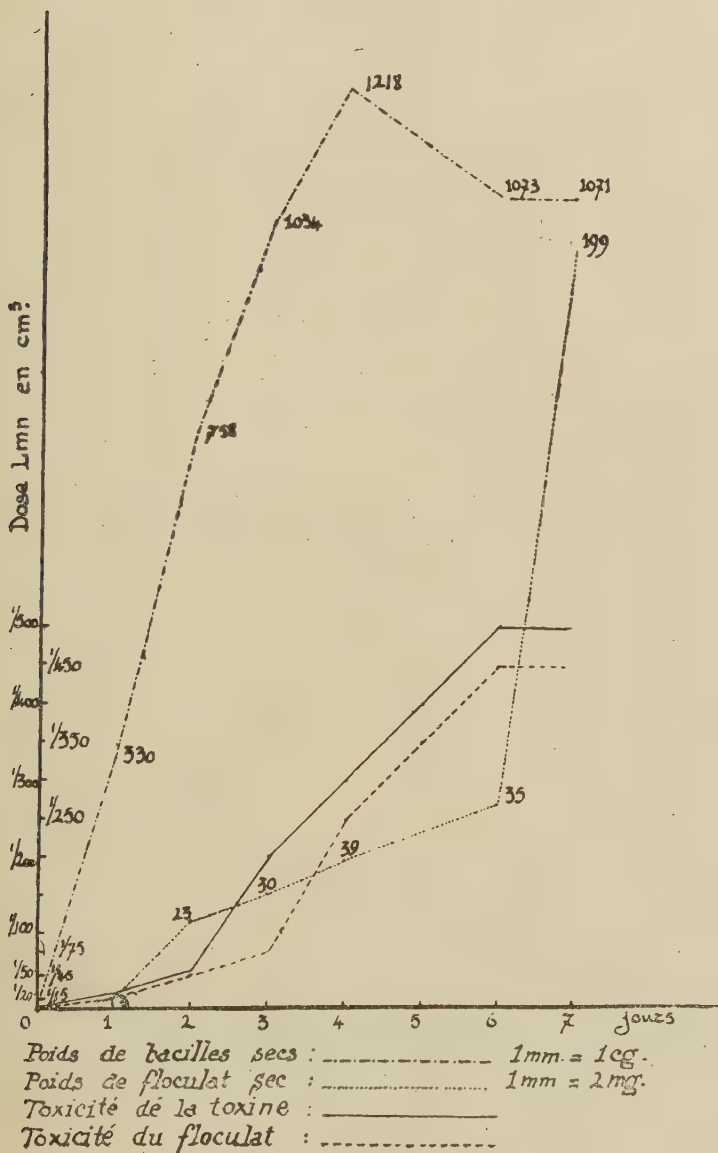
Essai sur le mode de formation de la toxine

On pourrait admettre, et c'est une hypothèse qui a été envisagée par plusieurs auteurs, que la substance toxique se produit par une modification des protides du bouillon. C'est ainsi que Dzierzowski et Rekowski émettent cette idée : la substance toxique est formée au dépens des substances de la peptone, solubles dans l'alcool. A la même époque Jules Courmont et Doyon pensent que le bacille ne fabrique pas directement de la toxine, mais une substance soluble, qui, au contact de l'organisme récepteur, engendre la toxine. Ces conclusions rappellent celles de Walbum, d'après lesquelles le bacille élaborerait « une prototoxine », qui, en se combinant avec les albumoses du milieu, ferait la toxine. Cette prototoxine agirait à la manière d'un proferment (Ch. Richet). Plus récemment, Dernby, dans un travail relatif à la formation de la toxine diphtérique, suppose qu'il se forme, par autolyse des bacilles, et au sein du milieu, des ferments protéolytiques spécifiques, qui désintègrent les albumoses et les peptones du bouillon, pour donner le produit toxique ; à un degré de désintégration plus parfait, la

toxicité disparaît, et il ne reste plus que des produits non toxiques. Ainsi donc, pour les auteurs précédents, il conviendrait de rechercher dans les modifications du milieu nutritif, et plus spécialement des protides, l'origine du pouvoir toxique d'une culture filtrée de bacilles diphtériques. L'hypothèse de Dernby permet une explication des phénomènes observés par Roux et Yersin, qui ont étudié la variation de toxicité en fonction du temps et de l'alcalinité du bouillon. On sait que cette toxicité augmente pendant un certain temps, puis diminue, et que l'alcalinité du bouillon s'accroît. L'intervention de ferments solubles permet une explication presque satisfaisante.

Mais il ne semble pas interdit de faire intervenir le bacille diphtérique dans la formation de la toxine, autrement que par ses ferments solubles. Moloney et Hanna, à la suite d'une série d'expériences, dans lesquelles ils font des numérations de bacilles et éprouvent parallèlement la toxicité, admettent, que le développement microbien et la production de la toxine ne se font pas en même temps. La cellule bactérienne ne ferait la toxine qu'une fois devenue incapable de se diviser. Il ne semble pas que l'arrêt dans la culture soit dû à l'accumulation du poison, puisque de la toxine ensemencée permet la végétation. Il se peut que, durant la période de prolifération des bactéries, une substance atoxique se produise, qui sera ultérieurement transformée en toxine. Ignorant des travaux de ces auteurs, et suivant un protocole sensiblement analogue, nous avons réalisé une expérience, qui nous a conduits aux mêmes faits d'observation, mais nous les avons diversement interprétés. Pourquoi la lyse

des bacilles en libérant des protides n'expliquerait-elle pas la formation de la toxine ? C'est ce que nous avons tenté de rechercher en suivant pas pesées les



destinées des corps microbiens, et l'augmentation du flocculat, à différents jours. D'autre part, une expérimentation biologique nous permettait de suivre l'exaltation de la toxicité du bouillon de culture. Pour réaliser cette série d'expériences, nous avonsensemencé 7 ballons contenant chacun 1 litre de bouillon Martin et avons, chaque jour, séparé, les bacilles, par centrifugation, et le principe toxique, par précipitation à pH 4,7 et centrifugation. Après dessiccation jusqu'à poids constant, ces diverses substances ont été pesées. Sans doute, on ne pouvait affirmer, a priori, que les cultures seraient également fécondes dans chaque ballon ; mais les causes d'erreurs inhérentes à toute expérimentation ne pouvaient être réduites d'autre manière, et il était difficile d'imaginer un autre protocole.

En opérant ainsi, nous avons observé, dès le deuxième jour et les jours suivants, une étroite proportionnalité entre le poids de bacilles et le poids de toxine flocculée ; puis, au sixième jour, s'est produit une sorte de régression dans le poids des bacilles, comme d'ailleurs dans le poids de la toxine. Mais au septième jour, avec un poids de bacilles presque aussi faible qu'au troisième jour, et égal à celui du sixième, nous avons obtenu un poids considérable de toxine sèche. Si, à ce moment, on dose par la méthode de Machebœuf le phosphore total de la toxine sèche et du bacille sec, on arrive à des pourcentages très voisins : 1 gr. 35 % de phosphore dans les bacilles et 1 gr. 25 dans la toxine, comme nous l'avons déjà dit plus haut.

Par ailleurs, l'essai biologique, comme cela est

classique, montre que le bouillon acquiert une virulence croissante. Voici les chiffres notés dans l'expérience la plus nette sur les trois que nous avons faites et qui sont concordantes :

Jours	Poids de bacilles secs	Poids de toxine sèche floculée	Virulence du bouillon en cc. dose Lmn.	Virulence de la toxine floculée en cc. dose Lmn.
Premier jour..	0,330	0,003	1/20 cc.	1/15 cc.
Deuxième jour.	0,758	0,023	1/50	1/45
Troisième jour.	1,034	0,030	1/200	1/175
Quatrième jour	1,2186	0,039	1/300	1/250
Cinquième jour	»	»	1/400	1/350
Sixième jour..	1,073	0,0346	1/500	1/450
Septième jour.	1,071	0,199	1/500	1/450

En mettant à part le premier et le septième jour, on peut, par une simple règle de trois, constater, à partir du deuxième jour, une proportionnalité étroite, entre le poids de bacilles et le poids de toxine.

Cette proportionnalité avait d'ailleurs été constatée antérieurement par Berman et Rettger (1922), Hartley, Watson et Wallace, qui, au cours de la croissance du bacille et de la formation de la toxine, avaient vu la quantité d' « *amino-nitrogen précipitable* » augmenter progressivement. Ils ne rapportent d'ailleurs pas la formation de ces substances à la production de la toxine, mais plutôt à la croissance du bacille.

Il semble donc que le bacille, tout en s'accroissant, subît une lyse de plus en plus accentuée et enrichît, de la sorte, le bouillon, en principe toxique. Le premier jour, la lyse est pour ainsi dire nulle, mais elle

s'accroît ensuite pour aboutir à des proportions telles, que le poids des bacilles lysés est supérieur à celui des bacilles naissants. Ce phénomène est sans doute attribuable à l'alcalinité progressive du bouillon.

En effet, nous avons démontré que la toxine flocculée était constituée au moins en partie par des nucléoprotéides. Or ces protides sont solubles en milieu alcalin, et c'est par traitement alcalin, que l'on peut les extraire des cellules de la levure par exemple. D'autre part, en considérant la toxicité, on voit qu'elle croît d'une façon sensiblement proportionnelle au poids du floculat. Ce floculat est un protide de l'ordre des nucléoprotéides ; il n'existe pas dans le bouillon vierge ayant séjourné à l'étuve à 37°, ou dans le bouillon ensemencé depuis vingt-quatre heures.

Il est difficile de ne pas voir dans ces résultats une relation de cause à effet, et de ne pas conclure, que l'apparition de la toxine diphtérique est liée à la production de nucléoprotéides dérivant eux-mêmes par lyse des corps microbiens. Cette conception est déjà venue à l'esprit de nombreux auteurs, et surtout de ceux qui cherchaient à obtenir une toxine sur milieux chimiquement définis (Guinochet, Gamaléia, Von Groër).

Conceptions sur la constitution biologique de la toxine

Il est sans doute possible, déjà, de formuler une conception sur la constitution et le mode de formation de la toxine diphtérique.

Un faisceau d'arguments antérieurs, les expériences que nous avons citées plus haut, concordent pour faire admettre que la toxine diphtérique n'est autre que des bacilles diphtériques lysés. Le non accroissement de la culture vieillie permet de supposer que cette lyse se produit au cours même du développement, pendant les stades de végétation active du bacille, et selon toute vraisemblance aux dépens des éléments microbiens non encore arrivés à maturité. Si l'on poursuit l'hypothèse telle qu'elle apparaît comme une conséquence logique dans nos travaux, on conçoit qu'une telle lyse, qui pourrait être complète et aboutir à la formation de corps simples, minéraux ou organiques, dépourvus de toute activité, soit stabilisée à un moment de sa progression par le milieu nutritif lui-même qui sert à la végétation du bacille et par les peptones de ce milieu, qui jouent ici le rôle de colloïdes protecteurs. Ainsi se trouvent fixées les propriétés des « produits solubles du bacille diphtérique ».

Si nous poussons plus loin l'analyse de la toxine étudiée, nous arrivons à concevoir ce nucléo-protéide actif et toxigène, comme devant une partie de ses propriétés nocives aux ions qui lui sont accolés, et qui donnent sans doute au système colloïdal, qui les supporte, la marque de leur spécificité. Ainsi l'analogie formulée souvent déjà, entre les toxines microbiennes et les diastases trouverait un argument véritable, si l'on veut bien accepter la conception de MM. Hugou-nenq et Loiseleur, comme étant celle qui rend le mieux compte de la nature et du mode d'action des diastases.

Obtenue sous sa forme de toxine totale habituelle, la substance diphtérique, composée de l'engrenage de nucléo-protéides toxiques et de colloïdes stabilisateurs non spécifiques, évolue. Le contact prolongé ne parvient pas à empêcher la dissolution progressive des ions, qui, sans doute, lui confèrent sa toxicité, et ainsi on s'achemine par le vieillissement de la toxine, vers l'existence de corps nouveaux, qui sont, si l'on s'en tient à la terminologie d'Erhlich, les toxones et les toxoïdes. Les *toxones* qui fixent de l'antitoxine mais ne vaccinent pas, ne seraient que des *colloïdes non spécifiques* du bouillon, capables comme nous l'avons montré, d'adsorber l'antitoxine en présence des toxines floculées spécifiques. Les *toxoides* représentent la toxine inoffensive, mais pourvue encore de toutes ses propriétés antigène, vaccinante et adsorbante. Sous cette forme, elle paraît définitivement stabilisée.

C'est sans doute grâce à la présence des colloïdes qui renforcent, comme ils stabilisent, les propriétés antigènes de la toxine, que peut se produire lentement

l'évolution de la toxine diphtérique vers ces constituants terminaux. Autant que la toxine précipitable à pH 4.7 elle-même, ils jouent un rôle dans la démonstration de ces pouvoirs remarquables de la toxine totale.

Ceci n'est, on voudra bien l'admettre, qu'une tentative d'orientation vers une conception de la toxine diphtérique. Cette hypothèse ne saurait cependant prendre une place prépondérante dans les conclusions de notre travail, que nous limiterons à l'énoncé des faits d'expériences observés.



Conclusions ⁽¹⁾

I. — Nous avons pu, avec M. le Professeur Leulier et M. le Docteur Sédallian, isoler toute la fraction active d'une toxine diphtérique, en abaissant son pH à 4,7, et en recueillant le flocculat ainsi produit par une centrifugation rapide.

II. — On obtient un flocculat toxique, et un liquide décanté inoffensif.

III. — En flocculant des cultures identiques, mais d'âges différents, on obtient des flocculats de quantités variant progressivement au cours du développement du bacille, et la progression des poids de flocculats obtenus est parallèle à l'acquisition par le bouillon de culture des propriétés habituelles de la toxine diphtérique.

IV. — Ce flocculat toxique est essentiellement constitué par des nucléoprotéides. Il est soluble dans l'eau alcalinisée. La dialyse lui fait perdre son pouvoir toxique.

(1) Nous n'avons pas mentionné, dans nos conclusions, la flocculation du mélange toxine-antitoxine de la toxine purifiée, nos résultats n'étant pas définitifs (Voir p. 57).

V. — Ce flocculat possède des propriétés vaccinales (cobayes et lapins), et il totalise le pouvoir immunisant de la quantité de toxine diphtérique considérée. Le liquide qui surnage, après centrifugation, n'a aucune propriété de cet ordre.

VI. — Mais cette propriété immunisante du flocculat remis en solution aqueuse, ne peut être mise en évidence, que s'il y a de la peptone ou encore de la gélatine dans cette solution.

Privée de ces dernières substances, la solution de flocculat ne manifeste que très rarement une propriété vaccinale : ceci ne s'observe qu'exceptionnellement et lorsque, par divers procédés, entre autres le vieillissement, on lui a fait perdre ses propriétés toxiques.

VII. — Le formol, s'il est mis en contact avec du flocculat, sans peptone ni gélatine, le « bakélise », et lui fait perdre toutes ses propriétés aussi bien vaccinales que toxiques ; l'on ne peut obtenir ainsi une « anatoxine ». Mais on obtient celle-ci, si ce flocculat est en présence d'une de ces substances (protides). Celles-ci se comportent donc comme des substances protectrices contre la destruction des propriétés immunisantes par le formol.

VIII. — Nous avons cherché quelles sont les facultés d'adsorption, pour l'antitoxine spécifique, soit du flocculat, soit du liquide surnageant après centrifugation, en comparant avec la toxine totale.

Le liquide surnageant n'a aucune propriété adsorbante.

Bibliographie

- ABT et LOISEAU. — Réaction du milieu et production de la toxine diphtérique. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1922, 36, 535-561.
- ABT. — Sur la purification de la toxine diphtérique au moyen des précipités de phosphate de calcium. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1928, 42, 1336 à 1365.
- ARRHENIUS. — La chimie physique dans ses rapports avec la sérothérapie. *Bull. de l'Institut Pasteur*, 1904, 2, 553 et suivantes.
- ARRHENIUS et MADSEN. — Toxines et antitoxines. Le poison diphtérique. *Bull. de l'Acad. Royale des Sciences et des Lettres de Danemark*, 1904, n° 4, 269 et suivantes.
- Zur theorie der Bindung von Toxin und Antitoxin. *Berl. Klin. Woch.*, 1904, n° 9, 216 à 221.
- Immunochemistry. Macmillan, 1907. *Quantitative laws in biological chemistry*, London, 1915.
- D'ARSONVAL et CHARRIN. — Action des courants à haute fréquence sur les toxines bactériennes. *C. R. Acad. Sciences*, 1896, 122.
- BANZHAF. — Pathogenic micro-organisms. *Park et Williams*, 1920, p. 175.
- BERTHELOT et RAMON. — Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines. *C. R. Acad. Sciences*, 1925, 180, 340.
- BILTZ, MUCH et SIEBERT. — *Bull. Inst. Past.*, 1905, 473.
- BOCQUET. — Sur l'adsorption du venin de cobra et de la toxine diphtérique par le charbon. *C. R. Acad. des Sciences*, 1928, 187, 961.

- BORDET. — Sur le mode d'action des antitoxines sur les toxines. *Ann. Inst. Past.*, 1903, 17, 161-186.
- *Traité de l'immunité*, Masson, 1920, pp. 528-548.
- BRAUN et MUNDEL. — Action de la cystine sur le développement des bacilles diphtériques. *Centralbl. f. Bakt.* 1927, 53, 182.
- BRIEGER et FRAENKEL. — Untersuchungen ueber bacteriengifte. *Berl. Klin. Wochens.*, 1890, n^{os} 111 et 112.
- BUSSON. — Zur frage der Widerstandsfabrigkeit des neutralen diphterie-gemisches T. A. *Centralblatt fur Bakt.*, 1928, 105, 183.
- CALCAR. — *Berl. Klin. Wochens.*, 26 sept. 1904, 1028-1030.
- *Anal. Bull. Inst. Past.*, 1904, 967.
- CAMUS. — Spécificité et conditions d'action des précipitines. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, 54, 100.
- CLINTOCK et FERRY. — Production of immunity with over-neutralized diphterie toxin. *Centralblatt f. Bakt.*, 1911, 59, 456-463.
- COURMONT (J.) et DOYON. — Le tétanos, Paris, Baillière, dans *Actualités Médicales*.
- DANYSZ. — Sur les mélanges toxine-antitoxine. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1902, 16, 331-345.
- DERNBY. — Sur la formation de la toxine diphtérique. *C. R. Soc. de Biol.*, 1923, 93, 109.
- DERNBY et WALBUM. — Studien uber die Bildung des Diphterietoxins. *Communications de l'Inst. Sérothérapique de l'Etat Danois*, 1924, t. 15, 55 pages.
- DERNBY, Karl GUSTAV. — On the nature of diphteria toxin. *Jour. gén. physiol.*, 1926, 8, 311-315.
- DOERR. — Ueber die Reversibilitat bakterieller Toxine. *Bioch. Zeitsc.*, 1908, 7, 128.
- DREYER et MADSEN. — Ueber Immunisirung mit den toxonen des diphteriegiftes. *Zeitsch. f. Hyg.*, 1901, 37, 250-267.
- VON DUNGERN. — Beitrage zur Kenntniss der Bindungsverhältnisse bei der vereinigung der diphteriegift und antiserum. *Deutsch Med. Wochen*, 1904, n^o 8, pp. 275-277 ; n^o 9, pp. 310-312.
- DZIERZGOWSKI et REKOWSKI. — Recherches sur la transformation des milieux nutritifs par les bacilles diphtériques et sur

- la composition chimique de ces microbes. *Archiv. des Soc. biol. de St-Petersbourg*, 1892, 1, 167 et suivantes.
- EHRlich. — Ueber die Constitution des diphtheriegiftes. *Deutsche Méd. Wochenschrift*, 1898, 24, 597-600.
- Vorlaufige bemerkungen zur Mittheilung von Arrhenius. *Berl. Klin. Wochen.*, 1904, n° 9, pp. 221-223.
- FIELD et TEAGUE. — The electrical charge of toxin and antitoxin. *Jour. of exp. méd.*, 1907, 19, 86.
- FLEISCHMANN et MICHAELIS. — Die formulierung der Prazipitinreaktion nach Hamburger und Arrhenius. *Bioch. Zeitsch.*, 1907, 3, 425.
- GAMALEIA. — Action des ferments solubles sur le poison diphthérique. *C. R. Soc. de Biol.*, 1892, 4, 153.
- GESSARD et LOISEAU. — Contribution à l'étude des toxines précipitées. *C. R. Soc. de Biol.*, 1910, 22, 991-993.
- GLENNY, BARBARA et HOPKINS. — Quelques notes sur la modification de la toxine par l'aldéhyde formique. *Jour. of Path. and Bact.*, 1924, 27, 261.
- GLENNY, POPE et WADDINGTON. — The measurement of the combining power of diphtheria toxin and toxoid with antitoxin in relation to their antigenic efficacy. *Jour. of Path. and Bact.*, 1925, 28, 279-303.
- GLENNY et OKELL. — Sur la floculation de la toxine diphtérique avec l'antitoxine. *Journ. of Pathol. and Bact.*, 1924, 27, 187-200.
- GLENNY et WALPOLE. — *Bioch. Journ.*, 1915, 9, 298.
- GOROCHOWNIKOWA. — Zur frage der Widerstandsfabrigkeit des neutralen diphtheriegemisches T. A. *Central. f. Bakt.*, 1927, 103, 18.
- GRUBER et PIRQUET. — Toxin und antitoxin. *Munch. Med. Woch.*, 1903, 50, 1193-1196 et 1259-1263.
- VON GROËR. — Sur l'influence de la concentration en ions H sur la toxine diphtérique. *Bioch. Zeitschrift*, 1923, 138, 113-42.
- GUINOCHEt. — Contribution à l'étude de la toxine du bacille de la diphtérie. *Arch. méd. exp.*, 1892, 4, 487 et suivantes.
- HADLER et GORHAM. — Le bacille diphtérique sur les milieux sans protides. *Bull. Inst. Past.*, 1907, 5, 149.

- HENSEVAL et NÉLIS. — Recherches sur la vaccination antidiph-
térique à l'aide de l'anatoxine. *C. R. Soc. Biol.*, 1924,
91, 902.
- HOLLANDE et Mlle PENN. — Le trioxyméthylène sulfité et la
préparation de l'anatoxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*
1928, 99, 1196.
- HOSOYA et MIXATA. — Sur la nature de la toxine diphtérique.
C. R. Soc. Biol., 1928, 99, 1297.
- HUGOUNENQ et LOISELEUR. — Sur la constitution des diastases
protéolytiques et le mécanisme de leur action. *Bull. de
la Soc. de Chimie Biol.*, 1925, t. 7, pp. 955 et suivantes.
- IONESCU MIHAESTI et DAMBOVICEANU. — Sur la neutralisation de
la toxine diphtérique par l'antitoxine correspondante.
Influence de la réaction du milieu. *C. R. Soc. Biol.*,
1924, 91, 504.
- KOULIKOFF et SMIRNOFF. — Nature physico-chimique de la
toxine et de l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Past.*,
1927, 41, 1166 et suivantes.
- KOULIKOFF, SMIRNOFF et Me BOBKOWA. — Conditions physico-
chimiques de la thermostabilité de la toxine diphté-
rique. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 98, 1412.
- KRAUS et BACHER. — Flockulation und Avidität der antitoxis-
chen Diphtherieheilsers. *Wien. Klin. Wochens.*, 1928,
41, Jahrgang.
- LE BOURDELLÈS et SÉDALLIAN. — Immunologie. Paris, Masson,
1929.
- LE FÈVRE DE ARRIC. — Action des colloïdes métalliques sur
la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, 1143.
- LEMATTE, BOINOT et KAHANE. — Dosage des minéraux contenus
dans les principaux agents. *Journ. de Pharm. et de Chi-
mie*, 1927, t. 5 p. 335.
- LEULIER, SÉDALLIAN et Mlle GAUMOND. — Etude analytique de
la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 1543.
- LEULIER SÉDALLIAN et Mme CLAVEL. — Conservation du pou-
voir antigène dans la toxine diphtérique précipitée.
C. R. Soc. Biol., 1928, 99, 1746.
- LEULIER, SÉDALLIAN et Mlle GAUMOND. — Toxine diphtérique,
nucléoprotéides et dialyse. *C. R. Acad. des Sciences*,
1927, 185, 902.

- LEULIER, SEDALLIAN et Mme CLAVEL. — Etudes sur la toxine diphthérique. Analyse chimique et analyse biologique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, 11, 413-436.
- LOCKE et MAIN. — The nature of diphtheria toxin. *Jour. of Inf. dis.*, 1928, 43, pp. 41-59.
- LOEFFLER. — Den gegenwartige stand der Frage nach der entstehung der Diphterie. *Deutsch Med. Woch.*, 1889, N^{os} 5 et 6.
- LOEWY. — Beitrage zur Toxinentgiftung. *Centralblatt f. Bak.*, 1920, 84, 61.
- LOWENSTEIN et EISLER. — Ueber formalinwirkung auf tetanustoxin and andere bakterientoxine. *Centralblatt f. Bak.*, 1912, 61, 271.
- LOWENSTEIN. — Toxine und Toxoide, Urban et Schwarzenberg, Berlin, 1928.
- MACHEBOEUF. — Méthode permettant le dosage exact du phosphore dans de petites quantités de sang. *Bull. Soc. de Chimie Biol.*, 1926, 8, 464.
- MADSEN. — Constitution du poison diphthérique. *Ann. Inst. Past.*, 1899, 13, 568-580 et 801-832.
- MADSEN et SCHMIDT (S.). — Sur l'avidité du sérum antidiphthérique. *Ann. Inst. Past.* 1926, 40, 300-302.
- MARIE. — Glandes surrénales et toxi-infections. *Ann. Inst. Past.*, 1913, 27, 294.
- MARMIER. — Les toxines et l'électricité. *Ann. Inst. Past.*, 1896, 10, 469.
- MARTIN (L.). — Sérothérapie antidiphthérique. Médicaments microbiens. *Biblioth. Thérap. Baillière*, 1912, 3^e édition, p. 139.
- MOLONEY et HANNA. — Contribution to study of diphtheria toxin. *Scientif. Proceeding*, 1921, 19, N^o 1, New-York. *Anal. Bull. Inst. Past.*, 1922, p. 83.
- MOLONEY et BEECHER WELD. — Diphtheria toxin-antitoxin flocculation. *Jour. Path. and Bact.*, 1925, 28, 655-672.
- MORGENROTH. — Untersuchungen uber die Bindung von diphtherietoxin und antitoxin, sowie uber constitution des Diphteriegiftes. *Berl. Klin. Woch.*, 1904, 41, 526-530.
- MORGENROTH et VILLANEN. — *Virchows Archiv.*, 1907, 190, p. 371. *Anal. Bull. Inst. Past.*, 1908, 135.

- NELIS. — Recherches sur la vaccination antidiphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, 92, 1114 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, 142.
- Atténuation et pouvoir antigène de la toxine diphtérique traitée par diverses substances. *Ann. Inst. Past.*, 1926, 40, pp. 666-696.
- NERST. — Ueber die anwendbarkeit der Gesetze des chemischen gleichgewichts auf gemische von toxin und antitoxin. *Zeitsch. f. Electrochemie*, 1904, 10, 377.
- NEUMANN. — In *Précis de technique chimique* de A. Morel, p. 183.
- NICOLLE et LOISEAU. — Les facteurs de toxicité des bactéries. *Ann. Inst. Past.*, 1911, 25, 150.
- NICOLLE et CESARI. — Etudes sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes. *Ann. Inst. Past.*, 1920, 34, 148, 396, 709.
- OPPENHEIMER. — Toxin und antitoxin. Jena, 1904.
- OUCHINSKY. — Recherches sur la nature des poisons de la diphtérie et du choléra. *Arch. méd. exp.*, 1893, 5, 293.
- PICO et MIRAVENT. — Action de quelques substances sur l'intoxication et l'infection diphtérique expérimentale. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, 484.
- DE POTTER. — Sur l'atténuation de la toxine par l'acide chlorhydrique et la dissociation du mélange toxine-antitoxine. *Bull. Acad. Royale Méd. Belgique*, 1923, 3, 394.
- Action des agents oxydants sur la toxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, 422.
- La vaccination antidiphtérique à l'aide de la toxine chauffée. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, 895.
- PROSSKAUER et WASSERMANN. — Ueber die von den diphteriebacillen erzeugten toxischen Albumine. *Deutsch. Med. Woch.*, 1891, n° 17.
- RAMON. — La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtérique. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1923, 37, 1001-1011.
- Sur la toxine et l'antitoxine diphtériques. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1924, 38, 1-10 ; *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1925, 39, 1-25.

- De l'influence sur l'anatoxine de la précipitation par certains agents chimiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 1, 354-356.
- L'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Past.*, 1928, 42, 959-1009.
- Stabilité de l'anatoxine diphtérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 1, 1504-1506.
- REWSKY. — Ueber den isoelektrischen Zustand toxinhaltiger Bouillon. *Bioch. Zeitsch.* 1928, 197, 8-13.
- RENAUX. — Sur le titrage du sérum antidiphtérique par la méthode de floculation. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, 92.
- RICHEL. — Protoxines et toxines. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, 1, 500-502.
- ROMER. — Ueber die Einwirkung des galvanischen Stromes auf tetanus-gift tetanis antitoxin and toxin-antitoxin gemische. *Berl. Klin. Woch.*, 1904, pp. 209-213.
- ROUX et YERSIN. — Contribution à l'étude de la diphtérie. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1888, 2, 629-661 ; *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1889, 3, 273-288.
- SACHS. — Ueber den standpunkt Bordets in der Toxinfrage. *Centralblatt f. Bak.*, 1904, 37, 398-400.
- SALOMONSEN et MADSEN. — Recherches sur l'immunité active contre la diphtérie. *Ann. Inst. Past.*, 1897, 315.
- SBARSKY et NIKOLAEFF. — Zur Kenntnis des mechanismus der Immunitätserscheinungen. *Bioch. Zeits.*, 1927, 183, 419.
- SCHMIDT (H.) et SCHOLZ. — Studien zur Kenntnis der Eigenschaften von Diphtherie Toxin-Antitoxin-Gemischen. *Arch. f. Hyg.*, 1925, 95, 308-320.
- SCHMIDT (S.). — Contribution à l'étude du processus de neutralisation entre toxine et antitoxine. *C. R. Acad. Sc.*, 1927, 185, 1080.
- SCHMIDT (S.). — Le phénomène de floculation des toxines diphtérique et tétanique vis-à-vis de leurs antitoxines. *Ann. Inst. Past.*, 1928, 42, 63-105.
- SÉDALLIAN, et Mlle GAUMOND. — Sur l'isolement de la fraction active de la toxine diphtérique par abaissement du pH. *C. R. Soc. Biol.* 1927, 97, 93.

- SÉDALLIAN, LEULIER et Mme CLAVEL. — Répartition et stabilité des propriétés antigènes de la toxine diphtérique. Rôle des colloïdes non spécifiques. *C. R. Acad. des Sciences*, 1928, 1187; 1297.
- VINCENT (H.). — Sur les propriétés générales des cryptotoxines. *C. R. Acad. des Sciences*, 1926, 182, 1307 ; *C. R. Acad. des Sciences*, 1927, 184, 921.
- WADSWORTH et WHEELER. — Atténuation et production de toxine diphtérique. *The Journ. of Infec. Diseases*, 1928, 92, 279.
- WALBUM. — Sur la production de la toxine diphtérique. *C. R. Soc. de Biol.*, 1902, 97, 1224-1226.
- Studien uber die Bildung der bakteriellen Toxine. II. Diphtherietoxin, 47 pages. Commun. de l'Inst. Séroth. de l'Etat Danois, t. 12, 1922.
- Das Diphtherietoxin. Commun. de l'Inst. Séroth. de l'Etat Danois, 1924, t. 15, 55 pages.
- WATSON et WALLACE. — The concentration of diphtheria toxin by acid precipitation. *Jour. of Path. and Bact.*, 1924, 27, 289-298.
- Toxine diphtérique concentrée par précipitation acide. *Journ. of Pathol. and Bact.*, 1924, 27, 271-287.
- WATSON et LANGSTAFF. — The preparation and some properties of purified diphtheria toxin. *Bioch. Jour.*, 1926, 20, 763.
- WELLS. — Les aspects chimiques de l'immunité. Paris, Doin, 1918.
- ZRODOWSKI et HALIAPINE. — Recherches expérimentales et observations cliniques sur l'anatoxine diphtérique. *Ann. Inst. Past.*, 1928, 42, 1424-1446.
- ZINGHER. — Preparation and method of using toxin-antitoxin mixtures for active immunization against diphtheria. *Jour. of Inf. Dis.* 1917, 21, 493-496.
-

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	3
<i>La toxine diphtérique. Ses propriétés</i>	7
Le pouvoir toxique.....	7
Le pouvoir antigène	9
Le pouvoir de fixer l'antitoxine.....	14
Phénomène d'Ehrlich	15
Phénomène de Bordet-Danysz.....	22
Réversibilité du mélange.....	23
Floculation. Phénomène de zone.....	25
<i>Purification de la toxine par abaissement du pH à 4,7,</i>	
Milieux synthétiques	31
Précipitation par les agents chimiques.....	33
<i>Précipitation de la toxine par abaissement du pH à 4,7</i>	
<i>technique</i>	37
Etude chimique de la toxine précipitée.....	40
Etude biologique de la toxine précipitée.....	43
Le pouvoir toxique, dose Lmn, dialyse.....	42
Le pouvoir immunisant, essais de vaccination,	
action du formol, action des savons.....	47
Le pouvoir de fixer l'antitoxine : le pouvoir	
adsorbant	52
Floculation T. A.	55
<i>Essai sur le mode de formation de la toxine</i>	57
<i>Conceptions sur la constitution biologique de la toxine</i> ..	63
<i>Conclusions</i>	67
<i>Bibliographie</i>	71



IMP. BOSC FRÈRES & RIOU

• 42, QUAI GAILLETON •

• • • • • LYON • • • • •



